Annuale Rhythmen bei Schneehasen (Lepus timidus L.) und ihre Beeinflussung durch Photoperiode und Melatonin

Irmgard Küderling

1981

Dissertationsdruck: Schnelldruck Schwabing GmbH · Werneckstr. 27 · 8000 München 40 · ☎ 089/39 12 95

Annuale Rhythmen bei Schneehasen (Lepus timidus L.) und ihre Beeinflussung durch Photoperiode und Melatonin

Dissertation der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Irmgard Küderling
aus
Dabringhausen

Dezember 1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

1. Berichterstatter: Prof. Dr. B. Linzen

2. Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. A. Raab

Sondervotum: Prof. F. Fraschini, M.D.

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Februar 1981

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Oktober 1976 bis September 1980 am Pharmakologischen Institut der Universität Mailand, Italien, unter der Anleitung von Prof. Franco Fraschini, M.D., Lehrstuhl für Chemotherapie.

Herrn Prof. Fraschini danke ich für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis und die großzügige Förderung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. B. Linzen danke ich sehr für sein Interesse und die Vertretung dieser Arbeit vor der Fakultät.

Zu großem Dank bin ich Prof. M. Spagnesi und seinen Mitarbeitern W. Trocchi und M. Dellantonio, Institut für Wildtierbiologie, Bologna, Italien, verpflichtet, die durch ihre Mithilfe und die Zurverfügungstellung der Versuchstiere und -räumlichkeiten die Durchführung dieser Arbeit ermöglichten.

Ferner danke ich allen Mitarbeitern des Pharmakologischen Institutes in Mailand für wertvolle Ratschläge und Hilfeleistungen.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546818_0008

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
Einleitung		1
Hauptteil		
A.	Jahresperiodik von Hodengröße, Fellfärbung und Körpergewicht in natürlicher und konstanter Photoperiode	6
A.I.	Tierhaltung und Versuchsbedingungen	6
A.II.	Ergebnisse	10
A.II.1.	Körpergewichte	10
A.II.2.	Fellfärbung	11
A.II.3.	Gonadenentwicklung	13
A.III.	Schlußfolgerungen	15
B.	Einfluß von Photoperiode und Melatonin auf Hodenentwicklung und Fellfärbung zu verschiedenen Jahreszeiten	16
B.I.	Tierhaltung und Versuchsbedingungen	16
B.II.	Ergebnisse	18
B.II.1.	Vergleich der Hodenentwicklung in Sommer, Herbst und Winter	18
B.II.2.	Vergleich der Umfärbung in Sommer, Herbst und Winter	26
B.III.	Schlußfolgerungen	32
C.	Versuche zur Bestimmung von Serum-Melatonin mit verschiedenen Nachweismethoden	33
C.I.	Radioimmunologische Nachweismethoden	33
C.I.1.	Extraktion von Melatonin	34
C.I.2.	Radioimmunoassay für Melatonin	35
C.II.	Nachweis von Melatonin mit Gaschromatographie-Massenspektrometrie	42

Seite

Diskussion

A. Annuale : circannuale Periodik 44

B. Jahresperiodik und Melatonin 46

C. Biochemische Nachweismethoden für Melatonin 51

Zusammenfassung 54

Literaturangaben 56

EINLEITUNG

Bei vielen Säugetierarten insbesondere der gemäßigten Zonen unterliegen mehrere pyhsiologische Prozesse wie lokomotorische Aktivität, Hormonausschüttung und davon abhängige Funktionen, Fortpflanzung, Fellwechsel u.v.a. tages- oder jahresrhythmischen Veränderungen. Bei einigen dieser Funktionen konnte nachgewiesen werden, daß sie auch unter konstanten Bedingungen mit annähernd tagesperiodischer (circadianer) oder jahresperiodischer (circannualer) Frequenz ablaufen (ASCHOFF 1955, IMMELMANN 1967). So wurden beim Menschen gleichmäßig fortlaufende Körpertemperatur- und Schlaf-Wach-Rhythmen registriert, die jedoch in ihren Phasenlängen deutlich vom 24-Stunden-Tag und auch voneinander abwichen (ASCHOFF et al. 1967); Erdhörnchen hatten unter konstanten Bedingungen regelmäßige Brunst- und Winterschlafzyklen, die einige Wochen kürzer oder länger als das objektive Jahr waren (HELLER u. POULSON 1970). Ausführliche Übersichten über Untersuchungen zur circadianen und circannualen Periodik geben PENGELLEY u. ASMUNDSON (1974), ASCHOFF et al. (1975) und GWINNER (im Druck).

Endogene Rhythmen werden im allgemeinen durch Umweltfaktoren, sogenannte "Zeitgeber" (ASCHOFF 1954), mit der biologisch sinnvollen Tages- oder Jahreszeit synchronisiert. Einer der wichtigsten, weil zuverlässigsten, Zeitgeber ist für Säugetiere die Photoperiode (Länge der täglichen Lichtzeit) und ihre jahreszeitlichen Änderungen (FARNER 1961, BÜNNING 1973, HOFFMANN 1974). Durch Vorgabe künstlich veränderter Tage und Jahre können die Phasen spontan ablaufender Rhythmen verlegt werden. Das zeigen zum Beispiel Versuche an Menschen, bei denen der Schlaf-Wach-Rhythmus um 6 Stunden verschoben wurde (WEVER 1970), und Versuche

an Hirschen, die durch verkürzte "Jahre" in Abständen von nur 4 Kalendermonaten zum Geweihabwurf gebracht wurden (GOSS et al. 1974).

In entsprechender Weise können physiologische Prozesse, die offenbar nicht spontan rhythmisch ablaufen, durch die Photoperiode beeinflußt werden. Bei Hamstern, die unter konstanten Lichtbedingungen keinerlei jahresperiodische Veränderung in der Gonadenaktivität zeigen, können kurze Photoperioden im Sommer Hodenregression und lange Photoperioden im Winter die Wiederentwicklung der Gonaden hervorrufen (REITER 1972, HOFFMANN 1978).

Bisher ist noch weitgehend ungeklärt, wie das Umweltsignal "Tageslänge" vom Säugerorganismus übersetzt wird. Bei der Steuerung einiger Funktionen wie der sexuellen Aktivität und der Fellfärbung durch die Photoperiode spielt das Pinealorgan (Epiphysis cerebri) eine wichtige Rolle. So wurde die antigonadotrope Wirkung kurzer Photoperioden durch die Exstirpation der Drüse verhindert, und die Applikation von Pinealextrakten führte trotz des stimulierenden Einflusses langer Photoperioden zu Gonadenregression. Nach diesen Befunden hatte das Pineal einen antigonadotropen Effekt (Zusammenfassung s. REITER 1974). Allerdings wurden auch häufig diesem Konzept widersprechende Ergebnisse berichtet. Nach Untersuchungen an stark photoperiodischen Säugern wie dem Frettchen (HERBERT 1971) und dem Dsungarischen Hamster (HOFFMANN u. KÜDERLING 1975) ist das Pineal wahrscheinlich auch an der Übertragung progonadotroper Wirkungen von langen Photoperioden beteiligt.

Die Information über die Tageslänge erreicht das Pinealorgan bei Säugern von der Retina aus auf nervösem Wege über den Nucleus suprachiasmaticus und das obere Zervikalganglion und wird in der Drüse in hormonelle Information

umgesetzt (Zusammenfassungen s. KAPPERS 1976, MOORE 1978). (Da das Pineal bei Nichtsäugern auf grundsätzlich anderem Wege von der Photoperiode beeinflußt wird und möglicherweise auch andere Funktionen hat, wird hier auf eine Beschreibung der Verhältnisse bei diesen Tiergruppen verzichtet.) Das am besten untersuchte Epiphysenhormon, das an der Übersetzung der photoperiodischen Information beteiligt ist, ist das Indolderivat Melatonin (N-acetyl-5-methoxy-tryptamin). Seine Synthese ist streng lichtabhängig, denn die synthetisierenden Enzyme Serotonin-N-acetyltransferase und Hydroxyindol-o-methyl-transferase werden in der Lichtphase gehemmt und in der Dunkelphase aktiviert (KLEIN u. WELLER 1972, AXELROD 1974). Da Melatonin eine sehr kurze biologische Halbwertszeit hat (bei Ratten 11 min, nach KAMBERI et al. 1971), folgt die Konzentration in Pineal und Blut präzise dem vorgegebenen Licht-Dunkel-Wechsel (ROLLAG u. NISWENDER 1976, KENNAWAY et al. 1977). Bisher ist jedoch noch kein direkter Zusammenhang zwischen der diurnalen Melatoninsekretion und anderen tagesrhythmischen, physiologischen Vorgängen festgestellt worden.

Die Mehrzahl der Untersuchungen befaßte sich mit dem Einfluß von Melatonin auf jahresperiodische Phänomene, insbesondere auf die Fortpflanzung. Bei Schafen wurden jahreszeitliche Veränderungen der Melatoninausschüttung gefunden; im Winter waren die nächtlichen Melatoninmengen, aufgrund der längeren Dauer der Dunkelphase, höher als im Sommer (ROLLAG et al. 1978, ARENDT 1979). Die Wirkung von Melatoningaben war in der überwiegenden Zahl der Versuche ähnlich wie die von kurzen Photoperioden, die Gonaden regredierten und die Umfärbung ins weiße Winterfell wurde stimuliert (RUST u. MEYER 1969, HOFFMANN 1973, REITER et al. 1976, ALLAIN u. ROUGEOT 1980). Es wurden aber auch, sogar in denselben Tierarten, entgegengesetzte Effekte gefunden (HOFFMANN 1974, REITER u. VAUGHAN 1975, TUREK et al. 1976).

In Untersuchungen an Goldhamstern und dsungarischen Hamstern wurden einige der möglichen Ursachen für diese Widersprüche aufgedeckt. Danach ist die Wirkung von exogenem Melatonin nicht nur von der Art der Photoperiode während des Versuches abhängig, sondern auch von der Menge des applizierten Hormons und von der Phase des Tageszyklus und Jahreszyklus, in dem sich die Tiere zum Zeitpunkt der Verabreichung befinden (TUREK et al. 1975, TAMARKIN et al. 1976, BRACKMANN 1977, HOFFMANN u. KÜDERLING 1977). Außerdem werden die Tiere bei chronischer Melatoninbehandlung ebenso wie in kurzen Photoperioden nach einigen Wochen refraktär gegen den antigonadotropen Einfluß (REITER et al. 1979).

Die geschilderten Befunde führten zu der Annahme, daß die Information "Tageslänge" zumindest teilweise durch die Änderungen in der Melatoninmenge übertragen wird. Die Zugabe von exogenem Melatonin müßte demnach in natürlichen und künstlichen kurzen Photoperioden, in denen die endogene Hormonmenge über längere Zeit hoch ist, schneller als in langen Photoperioden zum Refraktärwerden der Tiere führen.

Zur Überprüfung dieser These wurden Untersuchungen an Schneehasen (Lepus timidus L.) durchgeführt; diese Tierart zeigt einen ausgeprägten Jahresrhythmus in Fortpflanzungsaktivität und Fellfärbung (SPAGNESI 1973). In einem Langzeitversuch sollte festgestellt werden, ob die genannten Funktionen und das Körpergewicht von der Photoperiode gesteuert werden,und ob sie einem endogenen, circannualen Rhythmus folgen. Die Analyse regelmäßig entnommener Blutproben sollte Aufschluß über die Schwankungen der endogenen Melatoninkonzentration im Verlauf eines Jahres geben. In drei weiteren Versuchen wurde die Wirkung von chronisch verabreichtem Melatonin zu verschiedenen Jahreszeiten und in verschiedenen Photoperioden untersucht.

Aus folgenden Gründen wurden Schneehasen als Versuchstiere gewählt:

1. Der Fellwechsel wird zumindest zum Teil durch die Photoperiode gesteuert (FARNER et al. 1973).
2. Die Tiere sind dämmerungs- bzw. nachtaktiv wie die meisten der für Untersuchungen über Melatonin verwendeten Säugerarten.
3. Da sie eine Lebenserwartung von mehreren Jahren haben, können sich jahreszyklisch ablaufende Veränderungen stabilisieren.
4. Die Tiere sind groß genug für wiederholte Blutentnahmen in größeren Mengen und klein genug für Käfighaltung.
5. Da bei der Züchtung in Abständen Wildfänge eingekreuzt werden, haben die Tiere weitestgehend die Charakteristika echter Wildtiere bewahrt.

HAUPTTEIL

A. Jahresperiodik von Hodengröße, Fellfärbung und Körpergewicht in natürlicher und konstanter Photoperiode

Der Zweck dieses Versuches war, festzustellen, ob Änderungen in den beobachteten Funktionen ausschließlich von der Photoperiode gesteuert werden, oder ob sie einem endogenen, circannualen Rhythmus folgen.

A.I. Tierhaltung und Versuchsbedingungen:

Die Hasen stammten von verschiedenen italienischen Züchtern, die ihre Zuchttiere aus Skandinavien erhalten. Über die Verwandtschaft der Tiere untereinander konnte keine Auskunft erteilt werden, jedoch konnte Inzucht aufgrund züchtungstechnischer Schwierigkeiten ausgeschlossen werden. Bis zum Versuchsbeginn waren die Hasen einzeln in Außenkäfigen gehalten worden und hatten mindestens einen vollständigen, natürlichen Jahreszeitenzyklus erlebt.

Der Versuch wurde im staatlichen Institut für Wildtierbiologie in Bologna (44° N, ca. 60 m Meereshöhe) durchgeführt. Die Tiere wurden einzeln in 180x80x60 cm großen Käfigen mit 50x60x40 cm großen Schlafkästen gehalten. Decke und Boden der Käfige bestanden aus verzinktem Maschendraht (Maschengröße 1,4x1,4 cm), die Wände und die Schlafkästen bestanden aus Eternit, so daß Sichtkontakt ausgeschlossen war (s. auch SPAGNESI 1973). Die Hasen wurden mit Standardpreßfutter für Kaninchen (C2EX, Fa. Palatamangimi, Bologna) und Wasser ad lib. gefüttert. Einmal pro Woche wurden ihnen Heu gegeben und das Trinkwasser mit Vitaminen (Fatrovit, Fa. Fatro, Bologna) angereichert.

Je zwei Tiere waren in verschiedenen Räumen untergebracht, die mit Styropor ausgekleidet und mit Ventilatoren versehen waren. Die Weibchen waren zur Verminderung olfaktorischer Einflüsse in von den Männchen getrennten Räumen untergebracht. Die Temperatur betrug überall $20 \pm 5^{\circ}$ C, die Luftfeuchtigkeit ca. 70%. Die Räume waren nicht speziell gegen akustische Beeinflussung geschützt. Da aber das Tierhaus in einem sehr ruhigen, ländlichen Areal ca. 5 km außerhalb des eigentlichen Stadtgebietes lag, war Straßen- oder Stadtlärm mit dem menschlichen Gehör nicht wahrnehmbar.

Die Hasen waren in 2 Gruppen aufgeteilt. Eine Gruppe, bestehend aus 1 Weibchen und 4 Männchen, wurde in natürlicher Photoperiode (Naturtag) gehalten. Die andere, 1 Weibchen und 3 Männchen, war einem konstanten Licht-Dunkel-Wechsel von 12 Stunden Licht zu 12 Stunden Dunkelheit (LD 12:12) ausgesetzt. Die Lichtquellen für die Naturtag-Gruppe waren je ein Fenster pro Raum. Die Räume der LD 12:12-Gruppe waren mit Leuchtstoffröhren mit annähernd natürlichem Lichtspektrum ausgestattet (TRUE-Lite Fluorescent (CRI 91) 40 Watt, Fa. Duro-Test International), die Fenster waren lichtdicht verkleidet. Die Beleuchtungsstärke in den Käfigen betrug zwischen 100 und 400 Lux.

Während des 18 Monate dauernden Versuches wurden alle 9 Schneehasen in 14-tägigen Abständen kontrolliert. 4 bis 5 Stunden nach Sonnenaufgang wurden sie mit $4 \pm 0{,}5$ ml Ketalar (50 mg/ml, Fa. Parke Davis) i.m. anästhetisiert, gewogen und die Hodengröße der Männchen durch Palpation bestimmt. Dabei wurden vier Stadien unterschieden:

Stadium 1 = Hoden nicht palpierbar, d.h. gänzlich rückgebildet und inaktiv;
Stadium 2 = Hoden klein (Länge nicht mehr als 2 cm);
Stadium 3 = Hoden mittelgroß (Länge zwischen 2 und 4 cm);

Stadium 4 = Hoden groß, voll aktiv (mindestens 4 cm lang).

Die Fellfärbung (Gesamterscheinungsbild) wurde gemäß einer willkürlich festgelegten 7-stufigen Skala bestimmt (s. Abb. 1 a-g):

Stufe 1 = Winterkleid, Fell rein weiß bis auf die schwarzen Abzeichen an den Ohrspitzen;

Stufe 2 = große, braune Abzeichen um die Augen und auf der Stirn, Rücken vom Hals bis zu den Hüften hell grau-braun meliert;

Stufe 3 = Gesicht fast vollständig braun, große braune Flecken vom Hals bis zu den Hüften entlang der Medianlinie;

Stufe 4 = Gesicht und Ohren braun, Decke außer Flanken und Hinterteil braun mit weißlichen Flecken;

Stufe 5 = Kopf und Ohren braun, Decke mit Flanken braun mit weißlichen Flecken, Hinterteil meliert;

Stufe 6 = Kopf und Ohren braun, Decke einschließlich Hinterteil braun mit weißlichen Flecken, Beine auf der Oberseite bis zu den Unterschenkeln braun gefleckt;

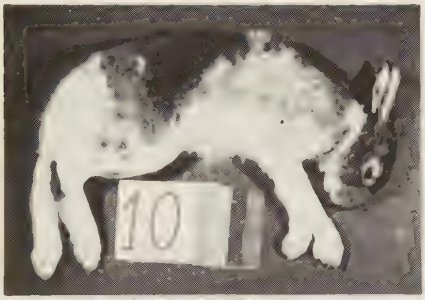
Stufe 7 = Sommerkleid, Kopf, Ohren und Decke gleichmässig braun, Schwanz auf der Oberseite bräunlich, Beine und Füße auf der Oberseite braun gefleckt.

Dieses Schema gilt generell für Frühjahrs- und Herbstfellwechsel. Individuelle Abweichungen kommen vorwiegend bei den Färbungsstufen 3 bis 5 vor.

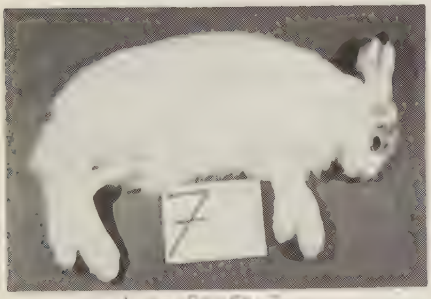
An jedem Kontrolltaq wurden den Tieren während der Kontrolle und abends 3 bis 4 Stunden nach Einsetzen der Dunkelheit 10 ml Blut abgenommen. Die abendlichen Blutentnahmen wurden bei Rotlicht durchgeführt und die Augen der Tiere mit einem dunklen Tuch abgedeckt. Um die Sklerotisierung der Venen weitgehend zu vermeiden, wurden die Blutproben abwechselnd aus den Hinterbein- und Ohrvenen entnommen. Als Anti-

Abb. 1 a - g:

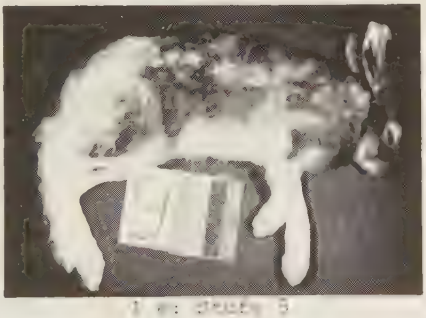
Färbungsstufen der Schneehasen während der Fellwechsel im Frühjahr und Herbst
Erläuterungen s. Text Seite 8



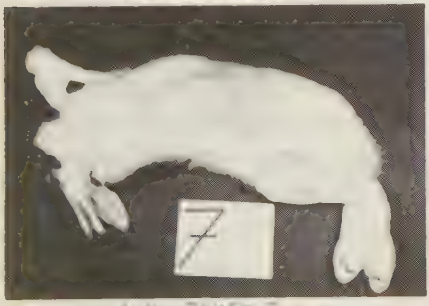
1 d: Stufe 4



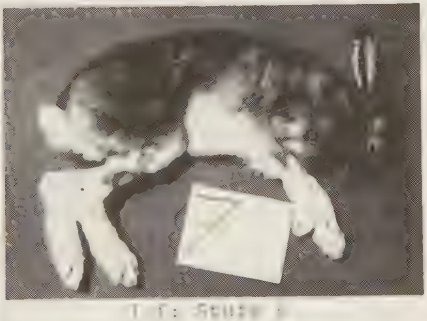
1 a: Stufe 1



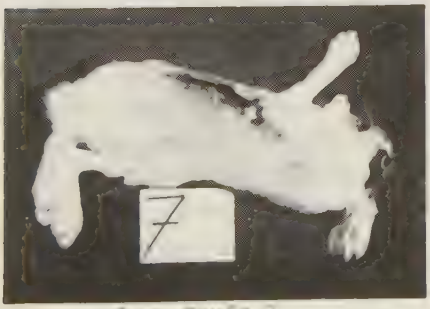
1 e: Stufe 5



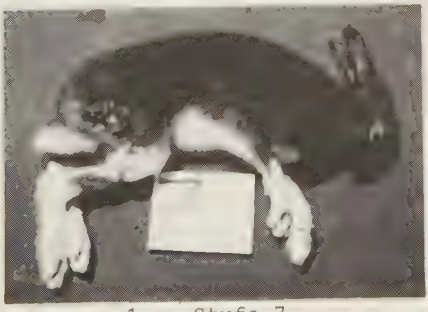
1 b: Stufe 2



1 f: Stufe 6



1 c: Stufe 3



1 g: Stufe 7

koagulans wurde jeder Probe etwas EDTA-Lösung (10 mg/ml) zugesetzt. Das Blut wurde 12 bis 24 Stunden bei $+4^{o}$ C aufbewahrt und dann bei ca. 1500 x g 30 min lang zentrifugiert. Das Plasma wurde in 3 Proben aufgeteilt und für spätere Untersuchungen bei -20^{o} C aufbewahrt.

Von den an den Kontrolltagen ermittelten Daten wurden jeweils die Gruppenmittelwerte und die Standardabweichungen der Mittelwerte berechnet. Die Signifikanzprüfungen wurden nach dem Student-t-Test durchgeführt.

A.II. Ergebnisse:

A.II.1. Körpergewichte

Bei keinem der Hasen, weder in natürlicher noch in konstanter Photoperiode, konnten jahresperiodische Schwankungen im Körpergewicht festgestellt werden (Abb. 2 oben). Die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen waren geringfügig und statistisch nicht zu sichern. Kurzfristige, geringe Gewichtsverluste bei einzelnen Tieren waren stets auf Verletzungen oder Verdauungsstörungen zurückzuführen. Ein Männchen in konstanter Photoperiode erlitt zu Beginn des Versuches eine schwere Enteritis, infolge derer es sehr mager blieb. Da aber das Tier trotz gleichbleibenden Untergewichtes völlig gesund erschien, wurde es im Versuch belassen.

Nach diesen Beobachtungen werden Änderungen im Körpergewicht von Schneehasen nicht durch die Photoperiode beeinflußt.

A.II.2. Fellfärbung

Die im Naturtag gehaltenen Hasen zeigten einen deutlichen Jahresrhythmus in der Fellfärbung (Abb. 2 Mitte). Zu Beginn des Versuches im Winter waren alle Tiere fast rein weiß, erste sichtbare Zeichen der Umfärbung ins Sommerfell (braune Abzeichen im Gesicht, Rücken hellbraun meliert, s. Abb. 1 b) wurden im März notiert. Der Frühjahrsfellwechsel dauerte ziemlich lange, erst im August hatten alle 5 Tiere die braune Sommerfellfärbung (Abb. 1 g) erreicht. Die Umfärbung ins Winterfell begann Anfang Oktober und verlief schneller als die Frühjahrsumfärbung, im Januar hatten bereits alle Tiere dieser Gruppe die maximale Winterfellfärbung erreicht. Im März wurden wieder erste Zeichen des Frühjahrsfellwechsels registriert.

Im zweiten Versuchswinter erreichte keines der Tiere ein rein weißes Winterfell, zwei blieben sogar zur Hälfte braun. Es ist anzunehmen, daß dies durch die für diese alpine Tierart gleichbleibend sommerliche Temperatur von ca. 20° C in den Versuchsräumen verursacht wurde. Befunde an einer nahe verwandten Hasenart, Lepus timidus scoticus L., unterstützen diese Vermutung (JACKES u. WATSON 1975). Außerdem ist auffällig, daß die Umfärbung, insbesondere im Frühjahr, jeweils mehrere Monate beanspruchte. Kontrollen, die jeweils zu Beginn der Fellwechsel gemacht wurden und für die den Hasen ein Stückchen Fell auf dem Rücken ausgezupft worden war, ergaben, daß das neue Fell innerhalb von ungefähr 6 Wochen bis zur maximalen Länge nachwächst. Da aber das Abstreifen des alten Haarkleides länger dauert als das Nachwachsen des neuen, beansprucht die Veränderung des Gesamterscheinungsbildes mehrere Monate und dauert im Frühjahr, aufgrund der längeren weißen Winterhaare, länger als im Herbst. Entsprechende Beobachtungen wurden an Lepus americanus gemacht (LYMAN 1943).

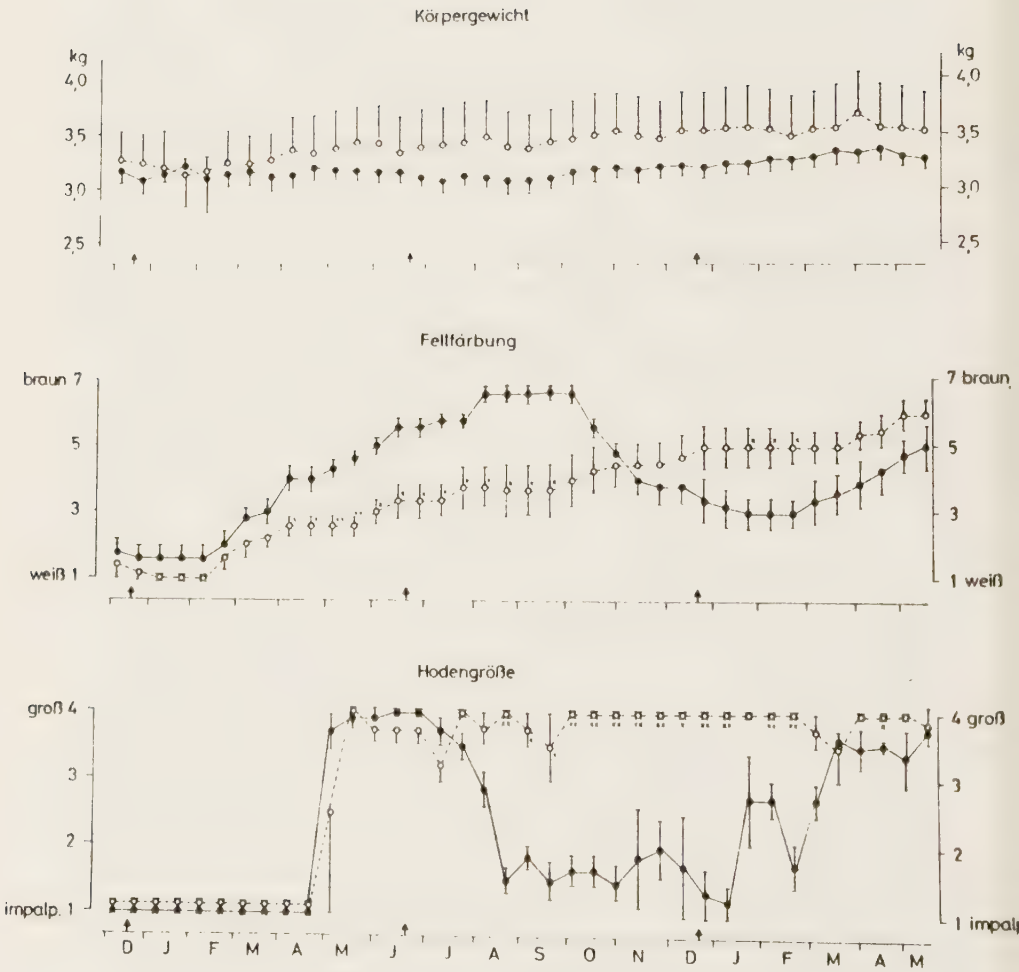


Abb. 2:

Änderung von Körpergewicht (oben), Fellfärbung (Mitte) und Hodengröße (unten) bei Schneehasen, die 18 Monate lang in natürlicher (●) oder konstanter (o) Photoperiode gehalten wurden.

Pfeile = Winter- und Sommersonnenwende; x = Unterschied zwischen den Gruppen signifikant mit $p < 0{,}05$, xx = Unterschied zwischen den Gruppen signifikant mit $p < 0{,}001$.

Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen der Mittelwerte.

Einteilung der Färbungsstufen und der Stadien der Hodengröße s. S. 7 u. 8.

Bei den in konstanter Photoperiode gehaltenen Hasen verliefen Fellwechsel und Umfärbung in einer sehr ungewöhnlichen und unerwarteten Weise. Wie bei den Naturtag-Tieren setzte der Fellwechsel im ersten Versuchsjahr im März ein, schritt dann aber mit extremer Verzögerung fort, so daß die Tiere zeitweilig, bedingt durch das Ausfallen der Winterhaare, große kahle Stellen im Fell aufwiesen. Erst am Ende des Versuches, ca. 15 Monate nach Beginn des Fellwechsels, war bei drei Tieren das Sommerfell annähernd vollständig nachgewachsen, während das vierte erst Stufe 5 der Umfärbung (Abb. 1 e) erreicht hatte. Anzeichen einer zyklisch verlaufenden Veränderung waren bei keinem dieser Tiere zu erkennen. Dieses Phänomen könnte damit erklärt werden, daß bereits vor Versuchsbeginn ein den Frühjahrsfellwechsel steuernder Prozeß eingesetzt hatte, der dann, infolge eines fehlenden Zeitgebers, mit stark verringerter und individuell unterschiedlicher Geschwindigkeit weiterlief. Sollte es sich um einen endogenen, zyklischen Prozeß handeln, so müßte er eine mehrjährige Phasenlänge haben.

Der Vergleich der beiden Gruppen zeigt, daß die Änderung der Fellfarbe in erster Linie von der Photoperiode gesteuert wird, während der Einfluß der Temperatur offensichtlich zweitrangig ist.

A.II.3. Gonadenentwicklung

Im Naturtag schwankte die Größe der Hoden aller Männchen sehr deutlich entsprechend den Jahreszeiten (Abb. 2 unten). Im ersten Winter waren die Hoden bis Ende April nicht palpierbar, deszendierten dann sehr schnell, innerhalb von 14 Tagen, und hatten maximale Größe bis Anfang Juli. Die Involution im Herbst verlief etwas langsamer, aber bereits Ende August waren die Hoden von 3 Männchen nur noch klein

bzw. nicht mehr palpierbar. Die Wiederentwicklung setzte im Januar ein, und ab März hatten alle 4 Männchen wieder überwiegend große, vollständig entwickelte Hoden. Bei einem Tier regredierten die Gonaden im zweiten Winter des Versuches niemals vollständig, und ab November wurden bei ihm starke Schwankungen in der Hodengröße registriert.

Die unvollständige Regression im zweiten Winter, insbesondere bei dem vierten Männchen, und die frühzeitige Wiederentwicklung wurden wahrscheinlich, ebenso wie die unvollständige Weißfärbung des Felles, durch die sommerliche Temperatur in den Versuchsräumen verursacht. Ein in dieser Weise modifizierender Einfluß der Temperatur wurde bei Hamstern nachgewiesen (SADLEIR 1969, DESJARDINS 1979). Die bei den Schneehasen registrierten, kurzfristigen Schwankungen der Hodengröße geben wahrscheinlich nicht die tatsächlichen Verhältnisse wieder. Es ist eher anzunehmen, daß sie auf irrtümlichen Bewertungen bei der Palpation beruhen. Da teilweise regredierte Hoden bei diesen Tieren sehr weich sind und sehr schnell in die Bauchhöhle zurückgezogen werden können, ist die Palpation während der Übergangszeiten schwierig und teilweise ungenau.

Bei den Männchen in LD 12:12 wurde keine jahresperiodische Änderung der Hodengröße beobachtet. Bis Ende April waren die Hoden nicht palpierbar, dann deszendierten sie bei zwei der drei Männchen und blieben von Mitte Mai bis zum Ende des Versuches stets groß und voll entwickelt. Bei dem dritten Männchen, das, wie beschrieben, untergewichtig geblieben war, wurden von Juli bis November und im zweiten Versuchsjahr im April und Mai einige Male sehr kleine Hoden palpiert. In der gesamten übrigen Versuchszeit waren sie offenbar vollständig regrediert und nicht palpierbar. Wahrscheinlich ist dieses Phänomen auf die Magerkeit des

Tieres zurückzuführen. Bekanntermaßen werden unterentwickelte und rangniedrige Tiere häufig nicht geschlechtsreif. Die anderen beiden Männchen dieser Gruppe zeigten einen Entwicklungsgang der Keimdrüsen, wie er schon mehrfach bei anderen in konstanter Photoperiode gehaltenen Säugetieren beschrieben wurde (REITER 1974, 1977): die Hoden deszendieren nach einer gewissen Zeit spontan und regredieren nicht mehr, solange die Tiere in derselben Photoperiode gehalten werden.

Wenn auch die Anzahl der Hasen, insbesondere in der LD 12:12-Gruppe, sehr klein war, so zeigt der Vergleich der beiden Gruppen doch deutlich, daß die jahresperiodische Änderung der Hodengröße, ebenso wie die Fellfärbung, vorwiegend von der Photoperiode und nicht von endogenen Faktoren gesteuert wird.

A.III. Schlußfolgerungen:

Die geschilderten Beobachtungen zeigen, daß bei Schneehasen ebenso wie bei mehreren anderen Säugern die Photoperiode eine entscheidende Rolle bei der Steuerung jahresrhythmischer Veränderungen spielt (Übersicht s. FARNER et al. 1973). Obwohl ein Einfluß der Temperatur nicht ausgeschlossen werden kann, wurden jahreszyklische Änderungen in der Fellfarbe und in der Hodengröße nur bei den Hasen beobachtet, die dem jahreszeitlichen Wechsel der Tageslänge ausgesetzt waren. Das Fehlen rhythmischer Veränderungen in konstanter Photoperiode hebt zum einen die Bedeutung der Tageslänge als Zeitgeber hervor, zum anderen deutet es darauf hin, daß die Jahresperiodik dieser beiden Funktionen unter den gegebenen Bedingungen keinem endogenen, circannualen Rhythmus folgt. Die bei allen Versuchstieren gleichbleibenden Körpergewichte lassen annehmen, daß die Photoperiode auf diese Funktion keinen Einfluß ausübt.

B. Einfluß von Photoperiode und Melatonin auf Hodenentwicklung und Fellfärbung zu verschiedenen Jahreszeiten

Die Versuche sollten zeigen, ob und in welcher Weise die Wirkung von langen und kurzen Photoperioden sowie von chronisch verabreichtem Melatonin von dem jahreszeitlichen Zustand der Schneehasen abhängt.

B.I. Tierhaltung und Versuchsbedingungen:

Die Versuche wurden in einem außerhalb von Mailand (45,5° N, ca. 100 m Meereshöhe) gelegenen Gebäude durchgeführt. Ebenso wie die für den Langzeitversuch (Abschnitt A) verwendeten Tiere stammten auch die in diesen Versuchen untersuchten Schneehasen von italienischen Züchtern und wurden bis zum Beginn des jeweiligen Versuches einzeln in Außenkäfigen gehalten. Die Käfige, Fütterung und Art der künstlichen Beleuchtung entsprachen den in Abschnitt A beschriebenen. Es wurden ausschließlich mindestens 1 Jahr alte Männchen verwendet.

Folgende Versuchsreihen wurden durchgeführt:

Sommertiere: vom 6.7. bis 24.8.1978 wurden jeweils 4 melatoninbehandelte und 2 Kontrolltiere in langer (LD 16:8) und kurzer (LD 8:16) Photoperiode gehalten;

Herbsttiere: vom 12.10. bis 29.11.1979 wurden jeweils 4 melatoninbehandelte und 3 Kontrolltiere in langer und kurzer Photoperiode gehalten;

Wintertiere: vom 8.1. bis 27.2.1980 wurden jeweils 4 melatoninbehandelte und 4 Kontrolltiere in langer und kurzer Photoperiode gehalten (ein melatoninbehandeltes Tier in LD 16:8 starb wäh-

rend des Versuches und wurde deshalb bei den Auswertungen nicht berücksichtigt).

Im Frühjahr konnte wegen Tiermangels keine Versuchsreihe durchgeführt werden.

Jeweils zu Versuchsbeginn wurden einer Gruppe von Hasen 30 cm lange, mit kristallinem Melatonin (Sigma Chemical Comp.) gefüllte Plastikschläuche (Dow Corning Silastic Brand, Medical Grade Tubing Cat. No. 602-235, Ø i. 1,47 mm, Ø a. 1,96 mm) unter die Rückenhaut implantiert. Die Kontrolltiere erhielten leere Schläuche als Placebo-Implantat. Die Operationen wurden unter Narkose (Ketalar 50 mg/ml, ca. 5 ml i.m./Tier) durchgeführt. Vorher wurden die Tiere gewogen, Hodengröße und Fellfärbung bestimmt (s. Abschnitt A) und 10 ml Blut/Tier aus den Unterschenkelvenen entnommen. Vom 10. (im Sommer 14.) Versuchstag an wurden die Hasen einmal wöchentlich gewogen und Hodengröße und Fellfärbung bestimmt. Bei der zweiten Kontrolle, also 17 bzw. 21 Tage nach Versuchsbeginn, wurde allen Tieren ein Stück Fell auf dem Rücken ausgezupft, um die Färbung des nachwachsenden Felles bestimmen zu können. Am Ende jeden Versuches wurden die Hasen getötet und 10 ml Blut pro Tier aufgefangen. Die Blutproben wurden wie in Abschnitt A beschrieben aufbereitet und das Plasma für spätere Untersuchungen aufgehoben. Die Melatonin-Implantate wurden herausgenommen, 24 Stunden lang bei $+50^{\circ}$ C getrocknet und gewogen. Die Menge freigesetzten Melatonins wurde aus der Differenz zu den Gewichten der Implantate bei Versuchsbeginn berechnet und betrug ca. 150 µg/Tag und Tier. Die Hoden wurden herauspräpariert, gewogen und für lichtmikroskopische Untersuchungen aufbereitet.

Die Durchmesser von jeweils 10 Tubuli seminiferi/Hoden wurden gemessen und das Stadium der Spermatogenese entsprechend der folgenden Einteilung bestimmt (vergl. HOFF-

MANN 1973 (Abb. 3 a-f):

Stadium 1 = Sertoli-Zellen, Spermatogonien, vereinzelt Spermatozyten 1. Ordnung;
Stadium 2 = viele Spermatozyten 1. Ordnung, vereinzelt Spermatozyten 2. Ordnung;
Stadium 3 = viele Spermatozyten 2. Ordnung, vereinzelt Spermatiden;
Stadium 4 = viele Spermatiden, einzelne, unreife Spermatozoen;
Stadium 5 = viele unreife Spermatozoen, in wenigen Tubuli reife Spermatozoen;
Stadium 6 = Tubuli voll mit reifen Spermatozoen.

Von den während und am Ende der Versuche ermittelten Daten für Hodengröße, Fellfärbung, Hodengewicht (Summe beider Hoden), Durchmesser der Tubuli seminiferi und Spermatogenese-Stadien wurden jeweils die Gruppenmittelwerte und die Standardabweichungen der Mittelwerte berechnet. Die Signifikanzprüfungen wurden nach dem Student-t-Test durchgeführt.

B.II. Ergebnisse:

B.II.1. Vergleich der Hodenentwicklung in Sommer, Herbst und Winter

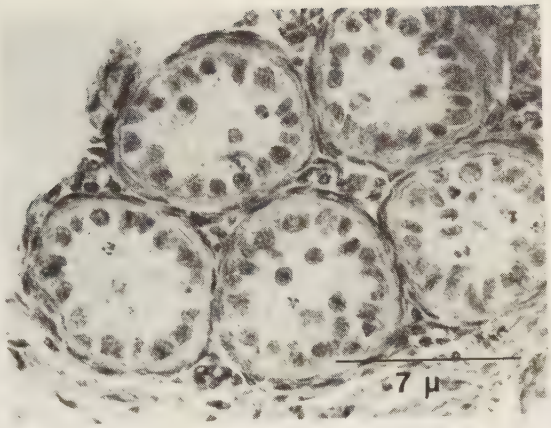
In allen drei Jahreszeiten verlief die Gonadenentwicklung, sowohl der melatoninbehandelten als auch der Kontroll-Hasen, in beiden Photoperioden ähnlich wie bei anderen Säugern (REITER 1978). Im Sommer blieben die Hoden der Kontrolltiere in langer Photoperiode während des ganzen Versuches unverändert groß, wogegen die Hoden der Kurztag-Kontrollen ebenso wie die der melatoninbehandelten Hasen in beiden Photoperioden zunächst signifikant ($p < 0.005$)

Abb. 3 a - f:

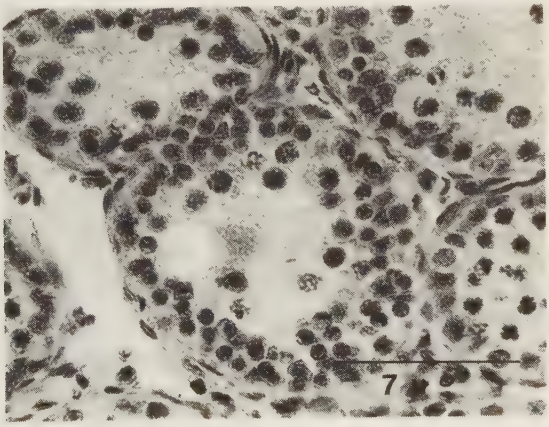
Stadien der Spermatogenese in Hoden von Schneehasen (Erläuterungen s. Text S. 18)

Färbung Hämalaun-Eosin

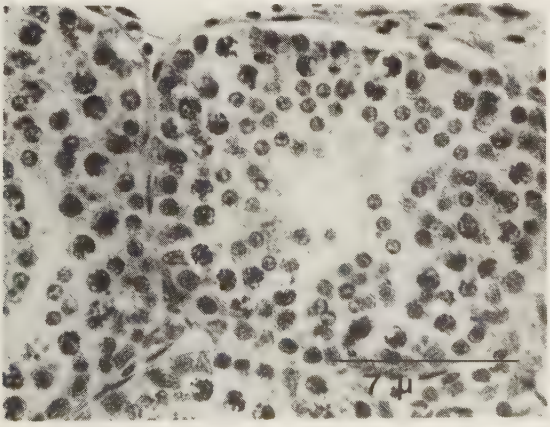
3 a: Stadium 1

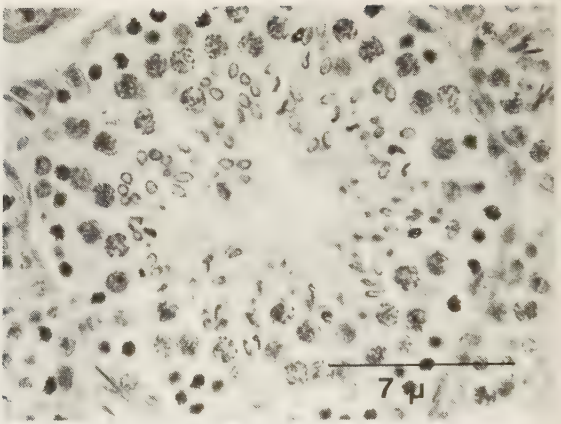


3 b: Stadium 2

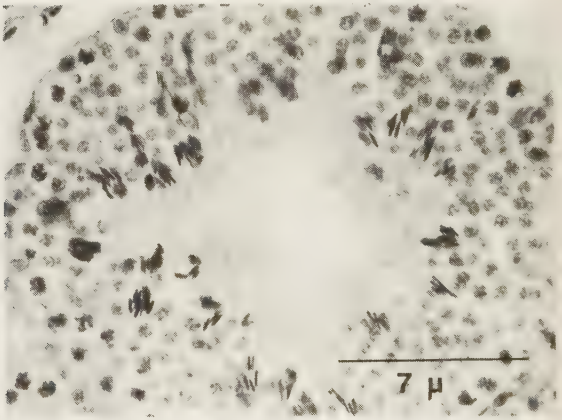


3 c: Stadium 3

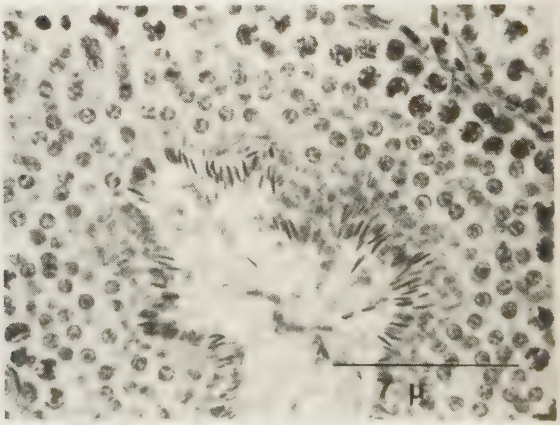




3 d: Stadium 4



3 e: Stadium 5



3 f: Stadium 6

regredierten (Abb. 4 oben). Die melatoninbehandelten Tiere im Langtag behielten dann bis zum Ende des Versuches gleichbleibend kleine Hoden, während die Gonaden der melatoninbehandelten und der Kontroll-Hasen im Kurztag ab der 4. Woche wieder an Größe zunahmen. Bei den Kurztag-Kontrollen verlief die Wiederentwicklung der Gonaden etwas schneller als bei den melatoninbehandelten Tieren in der gleichen Photoperiode, sie hatten am Ende des Versuches annähernd die gleiche Größe wie bei Versuchsbeginn.

Im Herbst waren die Gonaden aller Hasen bei Versuchsbeginn teilweise regrediert. Bei den Kontrollen in langer Photoperiode nahmen sie nach ca. 10 Tagen sehr rasch an Größe zu und blieben dann groß und annähernd voll entwickelt. (Abb. 4 Mitte). Bei den Kurztag-Kontrollen ebenso wie bei den melatoninbehandelten Hasen in beiden Photoperioden schritt die Involution langsam fort. Zwischen der 4. und 6. Versuchswoche waren die Hoden dieser 3 Gruppen signifikant ($p < 0.005$) kleiner als die der Langtag-Kontrollen. Nach der 6. Versuchswoche nahm das Hodenvolumen in beiden melatoninbehandelten Gruppen deutlich ($p < 0,01$) zu, während es bei den Kurztag-Kontrollen bis zum Versuchsende klein blieb. Ähnlich wie im Sommer verlief auch im Herbst die Wiederentwicklung bei den melatoninbehandelten Tieren in kurzer Photoperiode schneller als bei den Langtag-Tieren mit Melatonin-Implantaten. Der Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen war am Ende des Versuches signifikant mit $p < 0,005$.

Im Winter verlief die Hodenentwicklung bei allen Tieren in gleicher Weise (Abb. 4 unten). Die bei Versuchsbeginn in allen 4 Gruppen kleinen bis nicht palpierbaren Gonaden nahmen sehr schnell an Größe zu und hatten zum Schluß das maximale Volumen erreicht. Zu keinem Zeitpunkt des Experimentes konnten signifikante Unterschiede zwischen den

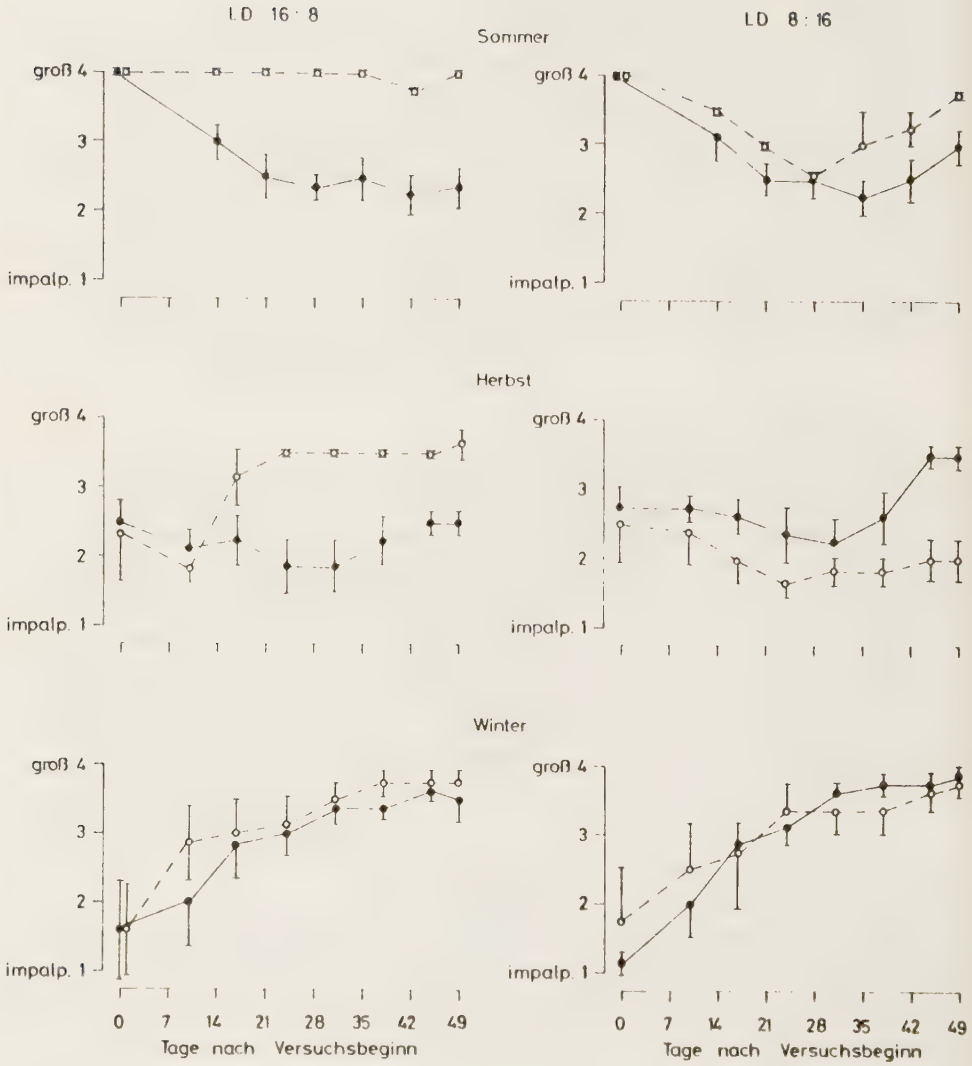


Abb. 4:

Veränderung der Hodengröße (durch Palpation bestimmt) von Schneehasen in langen und kurzen Photoperioden zu verschiedenen Jahreszeiten.

● = Tiere mit Melatonin-Implantaten, o = Tiere mit Kontroll-Implantaten

Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen der Mittelwerte.

Einteilung der Stadien der Hodengröße s. S. 7 u. 8.

Gruppen gefunden werden, d.h. weder Melatonin noch die Photoperiode beeinflußten die offensichtlich spontane Wiederentwicklung.

Die Hodengewichte (Abb. 5 oben) stimmten mit den Palpationswerten am Ende der Versuche nicht immer überein. In einigen Fällen ergab die Palpation gleiche Werte für die verschiedenen Gruppen, während die Gewichte hochsignifikant verschieden waren. Umgekehrt differierten einige Male die Palpationswerte signifikant, wogegen die Hodengewichte vergleichbar waren (Tab. 1). Diese Widersprüche können damit erklärt werden, daß bei der Palpation das Volumen der Gonaden bestimmt wird. Da die Hoden in den Übergangsstadien oft sehr weich sind (s. Abschnitt A.II.3.), können Gewicht und palpiertes Volumen durchaus differieren. Die Durchmesser der Tubuli seminiferi (Abb. 5 Mitte) und das Stadium der Spermatogenese (Abb. 5 unten) geben den tatsächlichen Zustand der Gonaden genauer wider, deshalb bezieht sich die folgende Besprechung vorwiegend auf diese Parameter.

Die histologischen Befunde ergaben im wesentlichen das gleiche Bild wie die Palpationen. Im Sommer und Winter war bei den Kontrolltieren kein Einfluß der langen oder kurzen Photoperioden zu erkennen, die Gonaden der Parallelgruppen waren am Ende der Versuche jeweils gleich weit entwickelt. Im Herbst dagegen war ein stimulierender Einfluß der langen und ein hemmender der kurzen Photoperioden deutlich zu sehen. Die Werte der Tubuli seminiferi und des Spermatogenese-Stadiums waren bei den Kurztag-Kontrollen klar erkennbar niedriger als bei den Langtag-Kontrollen, allerdings war dieser Unterschied statistisch nicht zu sichern.

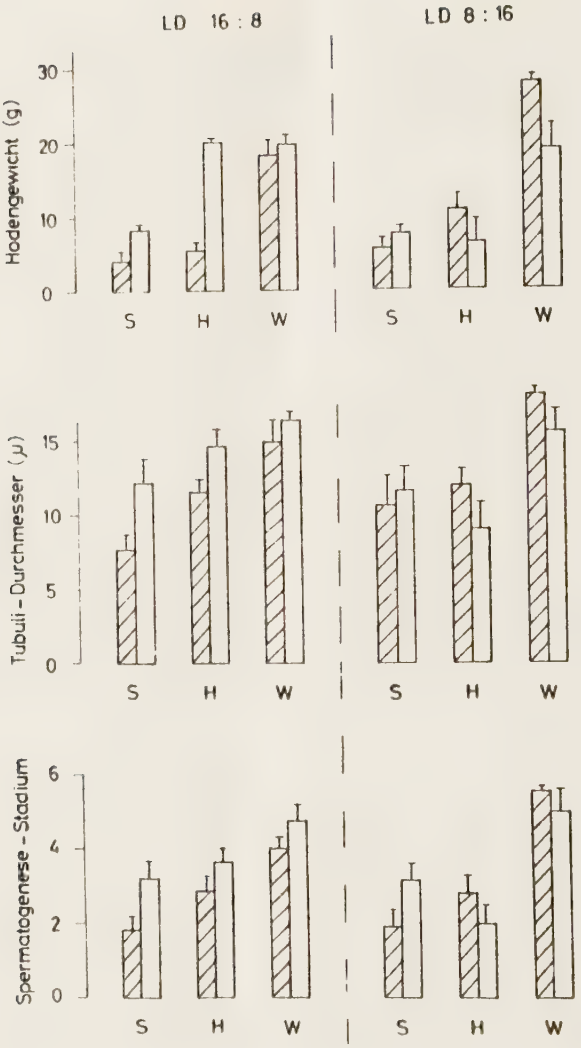


Abb. 5:

Hodengewichte in Gramm (Summe beider Hoden) (oben), Durchmesser der Tubuli seminiferi in beiden Hoden (Mitte) und Stadien der Spermatogenese in beiden Hoden (unten) bei Schneehasen nach 49 Tagen in langen und kurzen Photoperioden.

Gestrichelte Säulen = Tiere mit Melatonin-Implantaten, leere Säulen = Tiere mit Kontroll-Implantaten; S = Sommer, H = Herbst, W = Winter.

Angegeben sind Gruppenmittelwerte und Standardabweichungen der Mittelwerte.

Tabelle 1:

Signifikanzwerte für die Unterschiede im Hodenzustand zwischen den Versuchsgruppen. Angegeben sind die nach dem Student-t-Test ermittelten p-Werte. NS = nicht signifikant

Versuchsgruppen			Hoden-gewicht	Ø Tubuli seminif.	Spermato-genese	letzte Palpatio
Sommer	Melatonin	16:8 - 8:16	NS	NS	NS	NS
	Placebo	" - "	NS	NS	NS	NS
	16:8	Mel. - Plac.	NS	0,05	0,05	0,01
	8:16	" - "	NS	NS	NS	NS
Herbst	Melatonin	16:8 - 8:16	NS	NS	NS	0,005
	Placebo	" - "	0,02	NS	NS	0,01
	16:8	Mel. - Plac.	0,001	NS	NS	NS
	8:16	" - "	NS	NS	NS	0,01
Winter	Melatonin	16:8 - 8:16	0,02	NS	0,005	NS
	Placebo	" - "	NS	NS	NS	NS
	16:8	Mel. - Plac.	NS	NS	NS	NS
	8:16	" - "	NS	NS	NS	NS
Sommer - Herbst	Melatonin	16:8	NS	0,05	NS	NS
	"	8:16	NS	NS	NS	NS
	Placebo	16:8	0,005	NS	NS	NS
	"	8:16	NS	NS	NS	0,02
Sommer - Winter	Melatonin	16:8	0,005	0,01	0,02	0,005
	"	8:16	0,001	0,01	0,001	0,001
	Placebo	16:8	0,005	NS	NS	NS
	"	8:16	0,005	0,05	0,02	NS
Herbst - Winter	Melatonin	16:8	0,005	NS	NS	0,05
	"	8:16	0,005	0,005	0,005	0,02
	Placebo	16:8	NS	NS	NS	NS
	"	8:16	0,005	0,05	0,025	0,005

Melatonin wirkte in langen Photoperioden in allen drei Jahreszeiten leicht antigonadotrop; die Werte der behandelten Tiere waren stets niedriger als die der Kontrollen. Dieser Effekt nahm aber zum Winter hin deutlich ab, die Hasen wurden mit der fortschreitenden Jahreszeit zunehmend unempfindlicher für die Melatoningaben. In kurzen Photoperioden dagegen war ein hemmender Einfluß des Hormons nur im Sommer festzustellen; im Herbst und Winter waren die Hoden der melatoninbehandelten Tiere weiter entwickelt als die der Kontrollen. Im Herbst wurde der antigonadotrope Einfluß der kurzen Photoperioden weitgehend durch Melatonin aufgehoben, und im Winter wurde die Wiederentwicklung der Hoden möglicherweise noch durch die Hormonbehandlung beschleunigt.

B.II.2. Vergleich der Umfärbung in Sommer, Herbst und Winter

Das Gesamterscheinungsbild der Hasen ergab in keiner der drei Jahreszeiten nennenswerte Unterschiede in der Fellfärbung, die durch die Photoperioden oder die Melatoninbehandlung hervorgerufen sein könnten (Abb. 6). Entsprechend der Entwicklung in natürlicher Photoperiode (s. Abschnitt A.II.2.) blieben im Sommer alle Tiere annähernd braun, im Herbst färbten sie allmählich ins weiße Winterfell um, und im Winter deutete sich der Frühjahrsfellwechsel an. Zu keinem Zeitpunkt waren die Werte der Parallelgruppen signifikant verschieden, außer im Sommer am letzten Kontrolltag, an dem die Kurztag-Kontrollen etwas ($p < 0{,}05$) weißer erschienen als die melatoninbehandelten Tiere in gleicher Photoperiode (Tab. 2).

Allerdings gibt das Gesamterscheinungsbild, wie in Abschnitt A geschildert, die Veränderung der Fellfarbe in einer Zeit von nur 7 Wochen nicht wieder und erlaubt damit

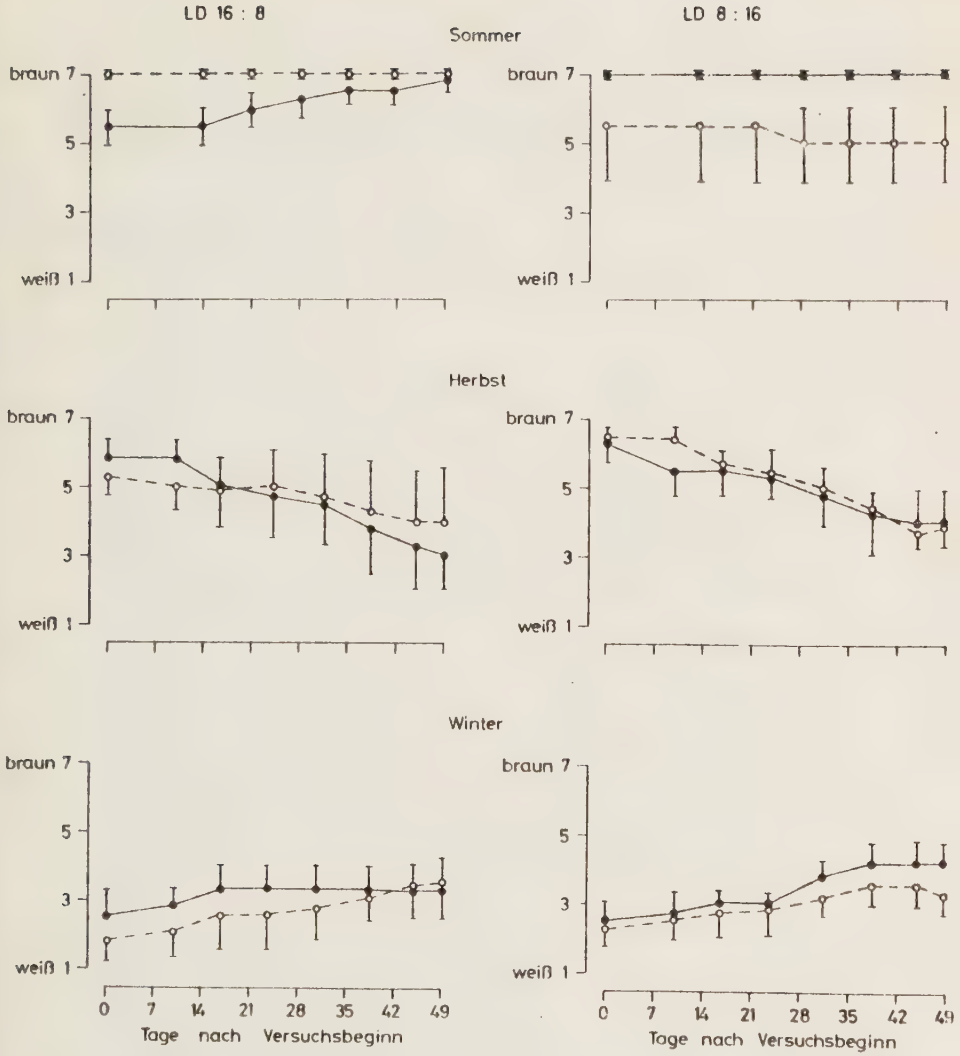


Abb. 6:

Änderung der Fellfärbung von Schneehasen in langen und kurzen Photoperioden zu verschiedenen Jahreszeiten
● = Tiere mit Melatonin-Implantaten, o = Tiere mit Kontroll-Implantaten.
Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen der Mittelwerte.
Einteilung der Färbungsstufen s. S. 8.

Tabelle 2:

Signifikanzwerte für die Unterschiede in der Fellfärbung zwischen den Versuchsgruppen. Angegeben sind die nach dem Student-t-Test ermittelten p-Werte. NS = nicht signifikant

Versuchsgruppen		Gesamtbild	nachgewachsenes Fell
Sommer	Melatonin 16:8 - 8:16	NS	NS
	Placebo " - "	NS	0,001
	16:8 Mel. - Plac.	NS	NS
	8:16 " - "	0,05	0,001
Herbst	Melatonin 16:8 - 8:16	NS	NS
	Placebo " - "	NS	0,005
	16:8 Mel. - Plac.	NS	0,005
	8:16 " - "	NS	NS
Winter	Melatonin 16:8 - 8:16	NS	NS
	Placebo " - "	NS	NS
	16:8 Mel. - Plac.	NS	NS
	8:16 " - "	NS	NS

auch keine Rückschlüsse auf den Einfluß der Photoperioden oder der Hormonbehandlung. Dagegen lassen die an der Stelle des ausgezupften Felles nachgewachsenen Haare die jeweils typische Färbung nach 4 bis 5 Wochen zweifelsfrei erkennen. Abb. 7 und 8 zeigen, wie sehr die Gesamterscheinung von der tatsächlichen Färbung des nachwachsenden Felles abweichen kann, an dem sehr deutlich die Einflüsse von Photoperiode und Melatonin zu erkennen waren.

Im Sommer und Herbst wuchs bei den Hasen mit Kontroll-Implantaten in langen Photoperioden braunes und in kurzen Photoperioden weißes Fell nach, die Art der Färbung war also eindeutig von der Art des Licht-Dunkel-Wechsels abhängig. Im Winter hingegen wuchs auch bei der Mehrzahl der Kurztag-Kontrollen braunes Fell nach. Die kurzen Photoperioden beeinflußten zu dieser Jahreszeit die Färbung offensichtlich nicht.

Auch die Wirkung von Melatonin wurde nur im Sommer und Herbst sichtbar. Im Sommer wuchs bei allen behandelten Tieren braunes Fell nach, die Weißfärbung im Kurztag wurde durch Melatonin verhindert. Im Herbst dagegen stimulierte das Hormon im Langtag das Nachwachsen weißer Haare bei drei Tieren (bei dem vierten Tier waren keine Haare nachgewachsen), während im Kurztag die Weißfärbung verzögert schien. Im Winter unterschieden sich die melatoninbehandelten Hasen nicht von den Kontrollen, sowohl im Kurztag wie im Langtag wuchs ihnen braunes Fell nach. Zu dieser Jahreszeit wird die Fellfarbe von Melatonin anscheinend ebensowenig wie von der Photoperiode beeinflußt.

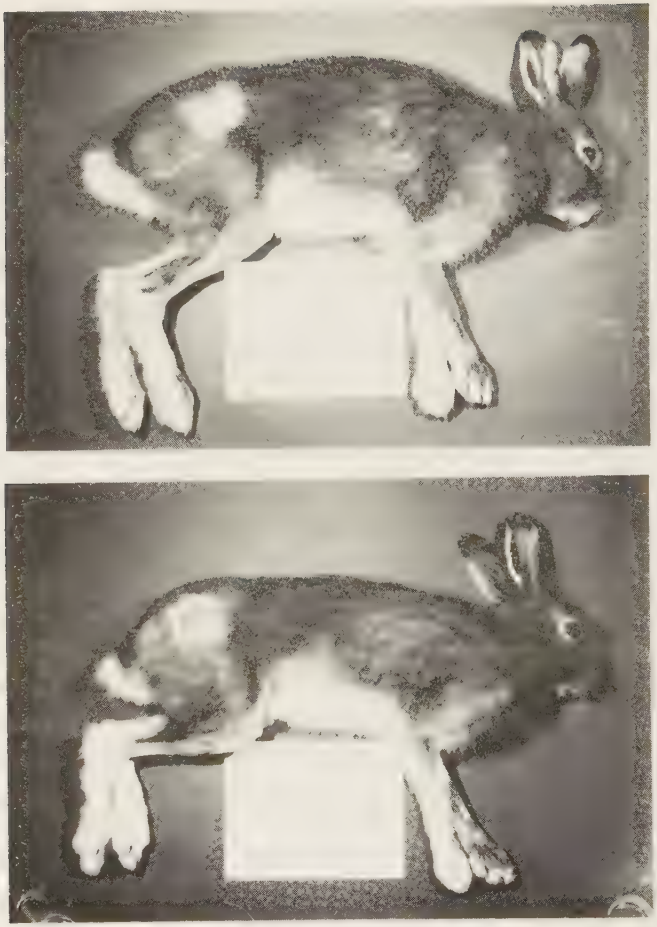


Abb. 7:

Zwei Beispiele für das Gesamterscheinungsbild und die Färbung der nachwachsenden Haare an der Stelle des ausgezupften Felles in Höhe der Hüfte.

Oben: Das Gesamterscheinungsbild ist braun, die nachwachsenden Haare sind weiß.

Unten: Sowohl das Gesamterscheinungsbild als auch die nachwachsenden Haare sind braun.

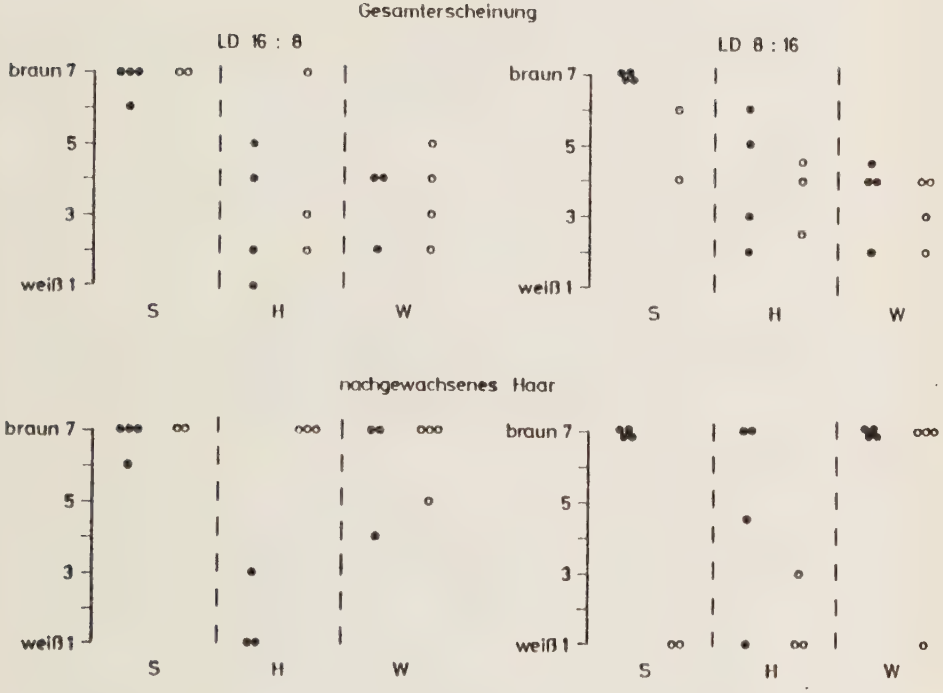


Abb. 8:

Färbung des Felles von Schneehasen nach 49 Versuchstagen in langen und kurzen Photoperioden zu verschiedenen Jahreszeiten.

Oben: Färbung des gesamten Felles, unten: Färbung der nachwachsenden Haare.
● = Tiere mit Melatonin-Implantaten, o = Tiere mit Kontroll-Implantaten; S = Sommer, H = Herbst, W = Winter; jeder Punkt oder Kreis symbolisiert ein Tier.

Einteilung der Färbungsstufen s. S. 8.

B.III. Schlußfolgerungen:

In Übereinstimmung mit Befunden an anderen Säugern (REITER 1978, HOFFMANN 1979) wirkten lange Photoperioden bei den Schneehasen zu allen Jahreszeiten progonadotrop. Kurze Photoperioden hatten nur im Herbst einen deutlich antigonadotropen Effekt, während sie im Sommer eine nur vorübergehende und im Winter keinerlei Hodenregression hervorriefen. Möglicherweise sind die Hasen zu diesen Jahreszeiten, ähnlich wie Goldhamster (STETSON et al. 1976), weitgehend refraktär gegen kurze Photoperioden. Bemerkenswert ist, daß die Hoden bei gleichem Volumen (gemäß Palpation) im Winter weiter entwickelt sind als im Herbst und Sommer (Abb. 4 und 5).

Die Wirkung von Melatonin war ebenso wie die der kurzen Photoperioden stark jahreszeitenabhängig. Der antigonadotrope Effekt des Hormons ließ zum Winter hin deutlich nach, in kurzen noch mehr als in langen Photoperioden. Die Entwicklung der Hoden im Verlauf der Versuche (Abb. 4) legt den Schluß nahe, daß die Hasen mit fortschreitender Jahreszeit refraktär gegen die Melatoninbehandlung werden (REITER et al. 1979), und daß der Beginn der Refraktärperiode durch die Kombination von kurzen Photoperioden und Melatonin vorverlegt wird.

Der Einfluß von Photoperioden und Melatonin auf die Fellfärbung war dem auf die Hodenentwicklung im Herbst und Winter vergleichbar. Im Herbst wurde die Weißfärbung durch die Kombination von Kurztag mit Melatonin etwas verzögert, und im Winter waren die Tiere offensichtlich refraktär gegen beide Arten der Behandlung. Im Sommer wirkte Melatonin dem Einfluß kurzer Photoperioden entgegen (Abb. 8), führte aber auch im Langtag, im Gegensatz zum Herbst, nicht zum Nachwachsen weißen Felles. Die Wirkung von Melatonin auf

die Fellfärbung, anders als die der Photoperioden, unterliegt anscheinend anderen Gesetzmäßigkeiten als seine Wirkung auf die Gonadenentwicklung.

C. Versuche zur Bestimmung von Serum-Melatonin mit verschiedenen Nachweismethoden

Die Bestimmung der Melatoninkonzentrationen in Blutproben, die den Schneehasen während der verschiedenen Versuchsreihen (s. Abschnitte A und B) abgenommen worden waren, sollte Aufschluß darüber geben, ob der endogene Melatoninspiegel jahresperiodisch schwankt, ob er durch die Photoperiode beeinflußt wird, und inwieweit er durch chronische Melatoninbehandlung verändert wird. Die Konzentrationsmessungen im Serum wurden mit radioimmunologischen und gaschromatographisch - massenspektrometrischen Methoden versucht. Da mit keiner der Bestimmungsmethoden reproduzierbare Werte gewonnen werden konnten, beschränkt sich der folgende Abschnitt auf die Beschreibung dieser Methoden und Hinweise auf technische Schwierigkeiten.

C.I. Radioimmunologische Nachweismethoden:

Seit 1975 wurden mehrere radioimmunologische Verfahren zur Bestimmung von Melatonin im Serum und in Geweben entwickelt. Sie unterscheiden sich hauptsächlich in der Extraktion von Melatonin und in Herstellung und Eigenarten der melatoninspezifischen Antikörper. Die Messung von Melatonin in gemischtem Schneehasenserum wurde mit folgenden 5 Antikörpern versucht:

- Ab Rabbit 1055 (Hersteller Dr. Rollag, Extraktion nach ROLLAG u. NISWENDER 1976),

- Ab K 244 (Hersteller Fa. Kabi Diagnostica, Stockholm, Extraktion nach WETTERBERG et al. 1978),
- Ab Guildhay 531 (Hersteller Dr. Arendt, Extraktion nach ARENDT et al. 1975),
- Ab D3 10/7 und Ab D5 11/12 (Hersteller Dr. Kennaway, Extraktion nach KENNAWAY et al. 1977).

C.I.1. Extraktion von Melatonin

Bei den genannten Methoden werden alle Proben nach dem folgenden Grundrezept extrahiert:

Die Leer- und Serumproben werden alkalinisiert und auf gleiche Volumina eingestellt. Danach wird ein Mehrfaches an Chloroform oder Dichlormethan dazugegeben und die Mischung ca. 15 min langsam geschüttelt. Die wäßrige Phase wird dann durch Zentrifugation bei mindestens 1000 x g abgetrennt und verworfen. Ein bestimmtes Volumen der organischen Phase wird in ein sauberes Reagenzglas überführt und unter einem Strom von hochgereinigtem Stickstoff bei +37° C evaporiert. Der Rückstand wird in einem Gelatine oder BSA enthaltenden, neutralen Phosphatpuffer aufgenommen und sein Melatoningehalt im Radioimmunoassay gemessen.

Die von den Autoren angegebenen Extraktionsmethoden unterscheiden sich in pH-Wert und Zusammensetzung der alkalinisierenden Lösung, Art und Volumen des organischen Extraktionsmittels, Extraktionszeit und -geschwindigkeit sowie Zentrifugationszeit und -geschwindigkeit. Meistens ist eine zusätzliche Reinigung der Extrakte erforderlich, die mit verschiedenen, kombinierbaren Maßnahmen vorgenommen werden kann:

- Waschung der organischen Phase mit alkalischer Lösung (0,1 N NaOH, 0,1 N KOH, 0,1 N $NaHCO_3$ o.ä.) und Wasser

vor der Evaporation (ARENDT et al. 1975, ROLLAG u. NISWENDER 1976, WETTERBERG et al. 1978);
- Filtration der organischen Phase durch einen silanisierten Wattebausch (WETTERBERG et al. 1978);
- Auftrennung des Rückstandes nach der Evaporation mittels Dünnschichtchromatographie (Silica Gel G 60, Chloroform/Methanol 9:1, ARENDT et al. 1975) oder Säulenchromatographie (Lipidex 5000 (Packard), Dichlormethan/Hexan 1:1, KENNAWAY et al. 1977) und Isolierung der melatoninhaltigen Fraktion;
- Waschen der wäßrigen Phase vor der Extraktion mit Petroläther (ARENDT et al. 1975).

C.I.2. Radioimmunoassay für Melatonin

Die von den Herstellern Arendt, Kabi Diagnostica und Kennaway angegebenen Rezepte zur Durchführung des Radioimmunoassays sind sehr ähnlich. Sie unterscheiden sich im wesentlichen in den Charakteristika der Antikörper und, in Abhängigkeit davon, in Molarität und pH-Wert des für den Assay verwendeten Puffers sowie den Inkubationszeiten. Als Beispiel sei hier die von KENNAWAY et al. (1977) angewandte Methode geschildert:

Als Puffer dient 0,1 M Natriumphosphat-Puffer, pH 7,4, der 0,9% NaCl, 0.1% NaN_3 und 0,1% Gelatine enthält. Nach der Zugabe von Gelatine ist der Puffer bei $+4^{o}$ C 14 Tage lang haltbar. Tritium-markiertes Melatonin (NET 458, Fa. New England Nuclear) wird in Aliquots von ca. 2 µCi/ml 96%igem Äthanol bei -20^{o} C aufbewahrt und unmittelbar vor Gebrauch soweit in Puffer verdünnt, daß 100 µl ca. 8000 cpm ergeben. Für die Erstellung der Eichkurve wird kristallines Melatonin (Fa. Sigma Chemical Comp.) kurz vor Gebrauch in Äthanol gelöst und in Puffer auf 10 ng/ml (Lösung B) und 1 ng/ml (Lösung A) verdünnt. Das Antiserum (D5 11/12) wird in wäßriger Lösung bei -20^{o} C in Aliquots von 0,5 ml aufbewahrt und unmittelbar vor Gebrauch in Puffer auf einen Titer von

1:3750 verdünnt. Die extrahierten und in Puffer aufgenommenen Proben werden vor der Verwendung ca. 1/2 Stunde bei +37° C oder Zimmertemperatur inkubiert.

Die verschiedenen Lösungen werden nach folgendem Schema zusammengegeben:

	Reihenfolge der Zugabe			
Ansatz (Probe Nr.)	1. Puffer (µl)	2. Melatonin f. Eichkurve (µl)	3. Extrakt (µl)	4. Antiserum (µl)
TC	700	-	-	-
NS	700	-	-	-
B_o	500	-	-	200
30 pg	470	30 A	-	"
50 pg	450	50 A	-	"
70 pg	430	70 A	-	"
100 pg	400	100 A	-	"
200 pg	480	20 B	-	"
300 pg	470	30 B	-	"
500 pg	450	50 B	-	"
1000 pg	400	100 B	-	"
1 - x je	-	-	500	"

TC = Gesamtmenge der zugegebenen Radioaktivität

NS = nicht spezifische Bindung radioaktiven Materials

B_o = Gesamtmenge des vom Antikörper spezifisch gebundenen, radioaktiven Materials

TC, NS und B_o werden dreifach angesetzt, die Eichkurve und die extrahierten Proben doppelt. Nach Zugabe des Antiserums werden 100 µl ^{3}H-Melatonin dazugegeben und sofort kräftig umgeschüttelt. Zur Inkubation werden die verschlossenen Proben mindestens 4 Stunden lang bei +4° C stehengelassen. Für die Fällung des Antigen-Antikörper-Komplexes

und zur Bestimmung der unspezifischen Bindung werden 0,8 ml einer gesättigten, neutralen Ammoniumsulfat-Lösung zu allen Proben außer TC zugegeben. Nach einer Inkubation von ca. 15 min. bei +4° C wird das Präzipitat bei 1560 x g abzentrifugiert und nach Verwerfen des Überstandes in 0,8 ml Wasser gelöst. Alle Proben werden in Szintillationsgläschen überführt, 4 ml Szintillationsflüssigkeit (Biofluor, Fa. New England Nuclear) dazugegeben, 2 bis 3 Stunden bei +4° C inkubiert, und die Radioaktivität der Proben in einem Szintillationszähler gemessen.

Die Werte der Eichkurve und der extrahierten Proben werden in % von B_o berechnet und der Melatoningehalt der unbekannten Proben mit Hilfe der graphisch dargestellten Eichkurve ermittelt. B_o, das in % von TC berechnet wird, sollte innerhalb einer Meßreihe ebenso wie zwischen verschiedenen Meßreihen um nicht mehr als 10% variieren. Auch NS sollte 10% von TC nicht überschreiten.

Der von ROLLAG u. NISWENDER (1976) entwickelte Radioimmunoassay unterscheidet sich von dem geschilderten dadurch, daß als radioaktiver Tracer ein mit ^{125}J markiertes Melatonin-Analog (N-3-(4-hydroxyphenyl)-propionyl-5-methoxytryptamin) und zur Fällung des Antigen-Antikörper-Komplexes ein zweiter Antikörper verwendet werden. Das Melatonin-Analog wird durch Zugabe von je 1 mMol 5-Methoxytryptamin, tri-n-Butylamin und N-succinimidyl-3-(4-hydroxyphenyl)-propionat zu 10 ml trockenem Dioxan synthetisiert. Nach einer Reaktionszeit von 1 Stunde bei Raumtemperatur und gelegentlichem Schütteln wird das weiße Präzipitat abzentrifugiert und verworfen. Zu dem Überstand werden 10 ml einer wäßrigen 0,1 M $NaHCO_3$-Lösung mit pH 8,0 gegeben, um überschüssiges N-succinimidyl-3-(4-hydroxyphenyl)-propionat zu hydrolysieren. Nach einer Stunde wird das Melatonin-Analog mit 10 ml Äthylacetat extrahiert. Die Äthylacetat/Dioxan-Phase wird zur Entfernung überschüssigen 5-Methoxytryptamins und tri-n-Butylamins mit 0,1 N HCl gewaschen und anschlies-

send unter Vakuum evaporiert. Der Rückstand, ein weißliches Öl, wird in 5 ml Methanol aufgenommen und in einer dunklen Flasche bei -20° C aufbewahrt. Diese Melatonin-Analog-Lösung ist annähernd 0,15 M (ca. 40 mg/ml).

Für die Markierung des Melatonin-Analogs mit ^{125}J wird 1 µl einer 1:10-Verdünnung der Ausgangslösung in 50 µl 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,1) aufgenommen und mit 1 µl Lactoperoxidaselösung (1 mg/ml) versetzt. Dazu werden 2 mCi $Na^{125}J$ hoher spezifischer Aktivität (Fa. Amersham) und 40 ng H_2O_2 in 10 µl Wasser gegeben und die Lösung 5 bis 10 min geschüttelt. Danach werden 100 µl eines 16%igen Sucrose-Puffers (22 mM Borsäure, 6,4 mM Na_2-EDTA, 14 mM Tris, pH 8,9) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird auf die Kathodenseite von 7,5%-Polyamid-Elektrophoresesäulen (5x75 mm) aufgetragen und ca. 70 min lang bei 4 mA in einem Puffersystem aus 11 mM Borsäure, 3,2 mM Na_2-EDTA und 7 mM Tris bei pH 8,9 elektrophoretisch aufgetrennt. Danach werden die Gele mittels einer feinen Spritze und H_2O aus den Säulen gelöst und in 20 annähernd gleich große Stücke zerschnitten. Die Fraktionen werden in je 1 ml 0,01 M Phosphatpuffer (0,9% NaCl, 0,1% Gelatine, pH 7,0) aufgenommen und die das markierte Melatonin-Analog enthaltenden Fraktionen in einem Gamma-Zähler ermittelt. Das monoiodierte Analog, das für den Radioimmunoassay verwendet wird, hat nach 70 min Elektrophorese etwa die Mitte der Säule erreicht, während das diiodierte Analog etwas weiter (ca. 2/3 der Säule) wandert. Die Probe mit der höchsten Konzentration monoiodierten Melatonin-Analogs wird zur Extraktion des Gels 12 Stunden bei +4°C stehengelassen. Anschließend wird sie mit 0,01 M Phosphatpuffer soweit verdünnt, bis 100 µl 30 000 - 40 000 cpm enthalten. Diese gebrauchsfertige Lösung ist bei +4°C bis zu 1 Monat haltbar.

Die Durchführung des Radioimmunoassays und die dafür benötigten Lösungen entsprechen im übrigen dem vorher geschilderten Schema, abgesehen von den wesentlich längeren Inkubationszeiten. Das Reaktionsgemisch wird hier vor und nach der Zugabe des radioaktiven Antigens jeweils 24 Stunden bei +4° C inkubiert; ebenso erfordert die Fällung des Antigen-Antikörper-Komplexes mit dem 2. Antikörper eine Inkubation von 24 Stunden. Die Radioaktivität des Präzipitats kann nach Abtrennung des Überstandes ohne weitere Aufbereitung direkt in einem automatischen Gamma-Proben-Zähler gemessen werden.

Für alle Methoden gilt gleichermaßen, daß bei jeder Meßreihe einige Kontrollproben mit verschiedenen, bekannten Melatoninkonzentrationen zwischen 0 und 1000 pg extrahiert und bestimmt werden. Die Leerprobe (0 pg) gibt Aufschluß über Verunreinigungen während der Extraktion; die Referenzproben ermöglichen die Bestimmung des bei der Extraktion entstandenen Verlustes, der bei der Berechnung des unbekannten Hormongehaltes der Serumproben berücksichtigt werden muß. Zusätzlich ermöglichen die Referenzproben eine Aussage über die Variation von Meßreihe zu Meßreihe und über die Präzision der Bestimmungen von hohen und niedrigen Konzentrationen.

Für die Extraktion und den Radioimmunoassay sind ausschließlich hochgereinigtes oder fabrikneues Glas- und/oder Teflonmaterial sowie chemisch äußerst reine Reagenzien zu verwenden. Die Einwaage von kristallinem Melatonin und die Herstellung der Melatonin-Standardlösungen sollten in einem separaten Raum und mit nur hierfür verwendetem Material vorgenommen werden.

Verschiedene Tests, die vor und in Abständen während der serienmäßigen Bestimmungen von Melatonin in Serumproben durchgeführt werden, geben Auskunft über die Spezifität des Antikörpers, dessen Charakteristika durch Lagerung und/oder Versand verändert sein können. In einem Parallelitätstest werden verschiedene Verdünnungen einer extrahierten Serumprobe gemessen, deren Werte eine zur Eichkurve parallele Linie ergeben, wenn die extrahierte und vom Antikörper gebundene Substanz mit Melatonin identisch ist. Ein Identitätstest, in dem die melatoninhaltige Fraktion des extrahierten Serums dünnschichtchromatographisch isoliert und dann gemessen wird, zeigt noch genauer, ob das antikörpergebundene Material mit Melatonin identisch ist. In einem Kreuzreaktionstest, in dem möglichst viele melatoninähnliche Substanzen in verschiedenen Konzentrationen getestet werden, werden die mit Melatonin interferierenden Substanzen ermittelt. Entsprechend den Resultaten aus diesen drei Tests muß die Extraktionsmethode nötigenfalls verbessert werden, damit eine zuverlässige Bestimmung von Melatonin gewährleistet ist.

Die Bestimmung von Melatonin mit radioimmunologischen Methoden ist nur dann als hinreichend präzise zu bewerten, wenn alle Kontrollen und Tests unzweifelhaft positiv ausfallen. Zur weiteren Absicherung der Resultate sollten stichprobenartig Messungen mit anderen Methoden wie Gaschromatographie - Massenspektrometrie (s. Abschnitt C.II.) durchgeführt werden.

Von den 5 getesteten Antiseren erwiesen sich nur zwei, K 244 und D5 11/12, als brauchbar. Ab R 1055, für das eine Verdünnung von 1:256.000 (Endtiter der Inkubationslösung) empfohlen wurde, wurde in 15 verschiedenen Verdünnungen zwischen 1:1000 und 1:256.000 und mit diversen zweiten Antikörpern in mehreren Verdünnungen getestet. Das Melatonin-Analog wurde zwar bis zu einem Titer von 1:64.000 (zweiter Antikörper 1:4 bis 1:14 als Endtiter) sehr gut gebunden, die Erstellung einer Eichkurve mit reinem Melatonin gelang jedoch in keinem Fall. Auch tritium-markiertes Melatonin, das vom Hersteller des Ab R 1055 für die Berechnung des Extraktionsverlustes verwendet wird, wurde nicht gebunden. Demnach war der Antikörper partiell degeneriert und hatte die Fähigkeit, reines Melatonin zu binden, verloren. Entsprechende Befunde aus anderen Laboratorien bestätigten dieses Ergebnis.

Mit Ab Guildhay 531 konnten bei einem Endtiter von 1:24.000 Eichkurven erstellt werden, sie variierten jedoch zu stark (B_o zwischen 22 und 56 %), um eine präzise Messung von Melatonin sicherzustellen.

Für Ab D3 10/7, das ebenfalls mehrfach ausprobiert wurde, bestätigte der Hersteller, daß es nicht ausreichend melatoninspezifisch war.

Die Versuche mit Ab K 244, dessen Bindungskapazität bei einem Endtiter von 1:24.000 32 ± 4% betrug, ergaben zufriedenstellende Eichkurven mit einer Schwankungsbreite von ca. 10%. Im Kreuzreaktionstest erwies sich 6-Hydroxymelatonin als die am stärksten interferierende Substanz. Eine 50%ige Hemmung der Melatoninbindung wurde mit einer 120-fach höheren Konzentration von 6-Hydroxymelatonin gefunden. Da der Parallelitätstest und der Identitätstest unbefriedigende Ergebnisse lieferten, wurde versucht, den Extrakt mit Hilfe von Dünnschicht- und Säulenchromatographie zu reinigen. Die Messungen konnten leider nicht fortgesetzt werden, weil der Antikörper nicht mehr lieferbar ist.

Die mit Ab D5 11/12 erstellten Eichkurven variieren lediglich um ca. 5%, die B_o-Werte betragen 31 ± 4% bei einem Endtiter von 1:15.000. Eine genaue Bestimmung der Melatoninkonzentrationen ist in einem Bereich zwischen 70 und 500 pg möglich. Vorläufige Messungen mit gemischtem Hasenserum, das aus tagsüber und nachts gesammeltem Blut im Verhältnis 1:1 bestand, ergaben Melatoninwerte zwischen 380 und 470 pg/ml Serum. Dr. Kennaway, der freundlicherweise eine Probe in seinem Labor mit demselben Antikörper bestimmte, fand 440 pg/ml.

Im Kreuzreaktionstest wurden bisher folgende 8 Indole geprüft: N-Acetylserotonin, 6-Hydroxymelatonin, 5-Methoxytryptophol, 5-Methoxytryptamin, 5-Hydroxytryptophol, Serotonin, Tryptophol und Tryptamin. Keine dieser Substanzen ergab eine nennenswerte Interferenz mit Melatonin, wenn die Proben extrahiert und säulenchromatographisch aufgetrennt wurden. N-Acetylserotonin erwies sich mit einer Konzentration von 1 µg/ml, dem $3{,}6 \times 10^3$-fachen der für 50%ige Hemmung benötigten Melatoninmenge, als das am stärksten kreuzreagierende Indol. Auch der Identitätstest verlief zufriedenstellend, nur die aus der melatonin-

haltigen Fraktion des Dünnschichtchromatogramms isolierte Substanz wurde spezifisch gebunden.

Der Parallelitätstest und die Extraktionen der Referenzseren (mit 0, 100, 300 und 500 pg Melatonin/ml angereichertes, gemischtes Hasenserum) ergaben allerdings uneinheitliche Resultate. Deshalb wurde versucht, die Extrakte vor der säulenchromatographischen Auftrennung zu reinigen. Jedoch führten Waschen der wäßrigen Phase mit Petroläther vor der Extraktion sowie Waschen der organischen Phase mit 0,1 N Kaliumborat, 0,1 N Salzsäure und Wasser nach der Extraktion nicht zu einer Verbesserung der Ergebnisse. Die Proben sind noch nicht abgeschlossen, so daß endgültige Resultate bisher nicht vorgelegt werden können.

C.II. Nachweis von Melatonin mit Gaschromatographie-Massenspektrometrie

Nach einer von CATTABENI et al. (1972) entwickelten Methode wurde versucht, Melatonin mit Hilfe der Gaschromatographie-Massenspektrometrie zu bestimmen. Bei dieser Methode wird Melatonin derivatisiert, so daß seine Flüchtigkeit erhöht wird. Das Melatoninderivat wird zusammen mit einer in gleicher Weise behandelten Standardsubstanz gaschromatographisch gereinigt und anschließend im Massenspektrometer fragmentiert. Das Fragment (bzw. die Fragmente), das aufgrund seiner Masse und Quantität als charakteristisches Fragment des ursprünglichen Melatoninderivats ausgewählt wurde, kann nach entsprechender Verstärkung gemessen werden. Mit Hilfe der Standardsubstanz, deren Konzentration in jeder Meßreihe konstant bleibt, und die sich von dem Melatoninderivat durch die gaschromatographisch unterschiedliche Trennungszeit und die Masse

des charakteristischen Fragments unterscheidet, können die Konzentrationen von Melatonin bestimmt werden.

Melatonin und Serumprobenextrakte wurden in 25 µl Äthylacetat aufgenommen und mit 40 µl Pentafluoropropion-anhydrid (PFPA, Fa. Pierce Chemical Comp.) zur Reaktion gebracht. Jeder Probe waren 2 ng deuterierten Melatonins als interner Standard zugegeben. Nach einer Inkubation von 3 Stunden bei +60° C wurde das Lösungsmittel unter einem N_2-Strom verdampft und die acylierten Melatonindefivate in 10 ul Äthylacetat aufgenommen. Diese Lösung wurde bei einem Heliumfluß von 20 ml/min und einer Temperatur von 240° C gaschromatographisch aufgetrennt (Säule 2 m x 4 mm, Füllung 10% OV1 Chrom Q 100/120 mesh). In einem Massenspektrometer (Finnigan 3000) wurden die Substanzen in einem Ionenstrom von 520 µA mit einer Elektronenenergie von 69,7 mV ionisiert und gespalten. Gemessen wurden die für Melatonin und deuteriertes Melatonin charakteristischen Fragmente mit der Masse 360 (Melatonin-PFPA) bzw. 362 (^{2}H-Melatonin-PFPA). Die Retentionszeit (Zeit zwischen Einspritzung und Registrierung) betrug 3 min 15 sec für beide Derivate.

Die Extraktion von Melatonin entsprach der für die radioimmunologischen Bestimmungen angewandten Methode und die Eichkurve umfaßte denselben Bereich (30 bis 1000 pg). Auch hier erwies sich eine weitere Reinigung der Extrakte als unbedingt erforderlich. Die Versuche mit dieser Methode konnten leider aus technischen und organisatorischen Gründen nicht weit genug fortgesetzt werden, um die zuverlässige Bestimmung von Melatonin in gemischtem Hasenserum zu ermöglichen.

DISKUSSION

A. Annuale : circannuale Periodik

Die Beobachtungen an den 18 Monate lang in konstanter Photoperiode gehaltenen Schneehasen hatten ergeben, daß die Tiere unter diesen Bedingungen keine jahresperiodischen Änderungen in Fellfärbung, Gonadengröße und Körpergewicht zeigen (s. Abb. 1). Aus diesem Befund kann jedoch nicht geschlossen werden, daß diese Funktionen grundsätzlich nicht auf einer endogenen, circannualen Rhythmik basieren. Möglicherweise wurde eine solche Rhythmik lediglich in der gegebenen Photoperiode von LD 12:12 nicht manifest und könnte in einem von LD 12:12 abweichenden, konstanten Licht-Dunkel-Wechsel beobachtet werden. Ein solches Phänomen wurde bei Sika-Hirschen nachgewiesen, die eine circannuale Rhythmik im Geweihabwurf nur dann zeigen, wenn sie einer von LD 12:12 verschiedenen konstanten Photoperiode ausgesetzt sind (GOSS 1977).

Entsprechend dieser Einschränkung gibt der Versuch auch keinen Aufschluß darüber, ob die Photoperiode bei den in natürlichem Licht-Dunkel-Wechsel gehaltenen Hasen die jahreszyklischen Änderungen von Hodengröße und Fellfärbung direkt verursacht, oder ob sie als Zeitgeber wirkt, der die endogene Rhythmik mit der Jahreszeit synchronisiert. Der Versuch zeigt jedoch eindeutig, daß die Photoperiode den Jahresgang der beiden Funktionen steuert. Diese Feststellung wird durch Untersuchungen an zwei anderen Hasenarten unterstützt (L. americanus: LYMAN 1943, DAVIS u. MEYER 1972; L. europaeus: FLUX 1965, LINCOLN 1976).

Auch andere Umweltfaktoren, insbesondere die Temperatur, scheinen die Hodenentwicklung und Fellfärbung bei Schnee-

hasen zu beeinflussen. Bei den im Naturtag gehaltenen Tieren waren Hodenregression und Weißfärbung im zweiten Winter weniger ausgeprägt als zu Beginn des Versuches, und es wurde angenommen, daß die Ursache hierfür die relativ hohe Temperatur von ca. 20° C war. Diese Annahme wird durch Beobachtungen an zwei anderen Hasenarten erhärtet. Bei L timidus scoticus wird der Beginn der Umfärbung durch die Photoperiode festgelegt, aber Grad und Schnelligkeit der Weißfärbung sind von der Temperatur und der Schneehöhe abhängig (JACKES u. WATSON 1975)). Die jahresperiodischen Schwankungen im Hodengewicht von L. americanus werden photoperiodisch gesteuert, aber die Hoden von Tieren, die bei ca. 22° C gehalten werden, regredieren im Winter weniger als die von in freier Wildbahn lebenden Hasen (DAVIS u. MEYER 1972). Bisher wurden noch keine eingehenden Untersuchungen über die Rolle der Temperatur bei der Regelung jahreszyklisch ablaufender Prozesse bei Hasenartigen durchgeführt. Die geschilderten Beobachtungen legen jedoch die Vermutung nahe, daß die Temperatur weniger den zeitlichen Ablauf der beiden Funktionen als vielmehr deren Ausprägungsgrad beeinflußt.

Im Körpergewicht zeigte keines der Versuchstiere jahresperiodische Veränderungen, es wird also nicht wie beispielsweise bei Dsungarischen und europäischen Hamstern (HOFFMANN 1973, CANGUILHEM et al. 1974) von der Photoperiode beeinflußt. Jahreszyklische Gewichtsänderungen, wie sie bei L. americanus in freier Wildbahn gefunden wurden (ROWAN u. KEITH 1959), sind wahrscheinlich auf andere exogene Faktoren wie Temperatur und Nahrungsangebot zurückzuführen. Auch hier kann über die Existenz einer endogenen, circannualen Rhythmik nichts ausgesagt werden, denn die für Gonadenaktivität und Fellfärbung gemachte Einschränkung gilt gleichermaßen für das Körpergewicht. Bei verschiedenen Säugerarten wurden circannuale Gewichtsschwankungen nachgewiesen (MROSOVSKY 1978, 1980), die von der Temperatur,

aber nicht von der Photoperiode gesteuert werden.

Definitive Aussagen über den Zusammenhang zwischen den exogenen Faktoren Photoperiode und Temperatur einerseits und dem Jahresgang von Gonadenaktivität, Fellfärbung und eventuell Körpergewicht bei Schneehasen andererseits ermöglicht der dargestellte Versuch nicht. Er zeigt jedoch deutlich, daß diese beiden Umweltfaktoren, insbesondere die Photoperiode, auch bei dieser Tierart eine wesentliche Rolle bei der biologisch sinnvollen Anpassung des Organismus an die Jahreszeiten spielt.

B. Jahresperiodik und Melatonin

Übereinstimmend mit Befunden an anderen Säugerarten (Übersicht s. HOFFMANN 1977) ergaben die Versuche zur Wirkung von Melatonin, daß dieses Pinealhormon auch bei Schneehasen an der Übertragung der photoperiodischen Einflüsse beteiligt ist. Das wurde besonders im Herbst deutlich, in dem Melatonin die Ausbildung des Sommerzustandes bei Tieren im Langtag verhinderte und damit auf Gonaden und Fellfärbung die gleiche Wirkung ausübte wie kurze Photoperioden (s. Abb. 4, 5 u. 8). Außerdem wurde eine klare Abhängigkeit der Melatoninwirkung von der jahreszyklischen Phase der Hasen festgestellt. Im Gegensatz zum Herbst hemmten im Winter weder Melatoningaben noch kurze Photoperioden die Wiederentwicklung der Hoden und die Braunfärbung des Felles, während im Sommer das Hormon ebenso wie Kurztag leicht antigonadotrop wirkte, aber nicht die Weißfärbung stimulierte.

Jahreszeitlich verschiedene Reaktionen auf Melatonin und kurze Photoperioden wurden auch bei der Gonadenentwicklung von Hamstern beobachtet (HOFFMANN 1977, 1979, REITER et al.

1979). Da das Hormon vorwiegend im Pinealorgan produziert wird, das an der Übertragung der Lichtwirkungen beteiligt ist, liegt die Vermutung nahe, daß die Wirkung von appliziertem Melatonin mit der Aktivität der Drüse zusammenhängt. Gemäß einem von REITER (1978) entworfenen Schema könnten die Beziehungen zwischen Photoperiode, Pineal und Gonadenaktivität folgendermaßen erklärt werden: In künstlichen oder (nach der Sommersonnenwende) natürlichen kurzen Tagen wird das Pinealorgan aktiviert, und seine Sekrete, darunter Melatonin, verursachen innerhalb weniger Wochen die Gonadenregression (inhibition phase). Dieser Zustand wird für einige Zeit, infolge der kurzen Photoperioden und der dadurch bedingten Aktivität des Pineals, aufrechterhalten (sexually quiescent phase). Bleibt die Tageslänge unverändert, dann setzt ungefähr 3 Monate später spontan die Wiederentwicklung der Gonaden ein (restoration phase). Als Ursache hierfür wird angenommen, daß die - bisher unbekannten - rezeptiven Systeme refraktär gegen den hemmenden Einfluß des Pineals werden. Die Refraktärphase (refractory period, sexually active phase), in der weder Melatonin noch kurze Photoperioden eine Wirkung haben, endet, wenn die Tiere einige Monate lang künstlichen oder natürlichen langen Photoperioden ausgesetzt werden, die sie "physiologisch pinealektomieren". Nach diesem Schema sind schwache oder widersprüchliche Reaktionen, wie sie bei den Schneehasen im Sommer festgestellt wurden, dann zu erwarten, wenn die Behandlung mit Melatonin oder kurzen Photoperioden zu Beginn der Übergangsphasen (inhibition phase und restoration phase) stattfindet.

Außer der geschilderten antigonadotropen Wirkung von Melatonin wurden auch häufig progonadotrope Effekte beobachtet, und zwar immer in Verbindung mit kurzen Photoperioden (HOFFMANN 1974, REITER et al. 1974, 1975, TUREK et al. 1975). Diese Untersuchungen gaben aber nicht den Verlauf der Gona-

denentwicklung, sondern nur den Hodenzustand am Ende der Versuche wieder. Da die Gonaden der in kurzen Photoperioden gehaltenen und mit Melatonin behandelten Tiere nach mehreren Wochen groß und voll entwickelt waren, kamen die Autoren zu dem Schluß, daß das Hormon die Hodeninvolution verhinderte und somit auch einen progonadotropen Einfluß ausüben kann. Die Beobachtungen an den Schneehasen (s. Abb. 4) ergaben indessen, daß Melatonin im Kurztag die Hodenregression nicht direkt verhindert, sondern vielmehr den Beginn der spontanen Wiederentwicklung und damit der Refraktärperiode vorverlegt. In neueren Untersuchungen an Goldhamstern wurde das gleiche Phänomen beobachtet (TUREK u. LOSEE 1978). Diese Befunde, ebenso wie Versuche an Frettchen, bei denen Melatoningaben den Beginn der Östrusphase verzögerten und das Ende vorverlegten (THORPE u. HERBERT 1974, 1976), legen den Schluß nahe, daß Melatonin nicht direkt anti- oder progonadotrop wirkt. Wahrscheinlicher ist, daß das Hormon im Zusammenspiel mit seinen spezifischen Rezeptoren beim zeitlichen Ablauf und der biologisch sinnvollen Koordinierung vermehrungsphysiologischer Prozesse mit der Umwelt eine regulierende Funktion hat.

In entsprechender Weise scheint Melatonin an der Steuerung von Fellwechsel und Umfärbung beteiligt zu sein. Die Beobachtungen an den Schneehasen weisen darauf hin, daß die Tiere im Winter refraktär gegen den Einfluß des Hormons und kurzer Photoperioden sind, denn das Nachwachsen braunen Felles wurde nicht verhindert. Im Herbst dagegen befanden sich die Tiere in einer sensiblen Phase, denn sowohl Melatonin als auch kurze Photoperioden stimulierten die Weißfärbung. Ebenso wie bei den Gonaden scheint auch hier die Kombination von Melatoningaben mit Kurztag zu einem vorzeitigen, refraktären Zustand zu führen, nur bei einem der melatoninbehandelten Hasen im Kurztag wuchs weißes Fell nach (s. Abb. 8). Im Sommer waren die Tiere

möglicherweise in einem Übergangsstadium zwischen refraktärer und sensibler Phase, in dem die Zufuhr von Melatonin den refraktären Zustand erneut herstellte, während der Einfluß der kurzen Photoperioden hierfür nicht ausreichte.

Auch die Beobachtungen an Dsungarischen Hamstern und Nerzen deuten auf eine Mitwirkung von Melatonin beim zeitlichen Ablauf des Fellwechsels hin. Bei Dsungarischen Hamstern verzögerte Melatonin die Umfärbung ins Sommerfell (HOFFMANN 1973), und bei Nerzen induzierte Melatonin den vorzeitigen Wechsel ins Winterfell (ALLAIN u. ROUGEOT 1980).

Wahrscheinlich sind sowohl die absolute Konzentration als auch die tägliche Dauer eines erhöhten Melatoninspiegels im Blut für den zeitlichen Verlauf der Gonadenaktivität und das Eintreten des refraktären Zustandes mitbestimmend. Die Untersuchungen von TAMARKIN et al. (1976, 1977) ergaben, daß bei Goldhamstern in LD 14:10 tägliche Melatonininjektionen zur Hodenregression führten, wenn sie vor Beginn der Dunkelheit oder am Ende der Nacht gegeben wurden, während Injektionen am Vormittag oder in der Mitte der Nacht keine Wirkung hatten. Da injiziertes Melatonin innerhalb von 3 bis 4 Stunden abgebaut wird (KENNAWAY u. SEAMARK 1980), sinkt der Hormonspiegel nach vormittäglichen und nächtlichen Injektionen auf die normalen Tages- oder Nachtwerte ab, bevor die nächtliche endogene Melatoninsekretion beginnt bzw. aufhört. Injektionen am späten Nachmittag oder am Ende der Nacht verlängern dagegen die Phase nächtlich erhöhter endogener Melatoninmengen. Damit entspricht die Zeitspanne anhaltend hoher Melatoninkonzentrationen der in kurzen Photoperioden und es kommt zur Hodeninvolution. Bei der Implantation von Melatonin dagegen ist der Hormonspiegel wahrscheinlich ständig erhöht, wobei sich das nächtlich synthetisierte Melatonin noch zu dem

exogenen summieren dürfte. Wenn nun Gonadenregression und Zeitpunkt des Refraktärwerdens nicht nur von der Dauer erhöhter Melatoninmengen, sondern auch, wie TUREK et al. (1975) zeigten, von der absoluten Konzentration abhängen, dann sollte die Kombination von Melatonin-Implantaten mit kurzen Photoperioden schneller als die mit langen Photoperioden und diese wieder schneller als Kurztag allein zum refraktären Zustand führen. Diese Überlegungen werden sowohl durch die Beobachtungen an den Schneehasen als auch durch Befunde von GOLDMAN et al. (1979) am Goldhamster gestützt.

Die Rolle des Pinealorgans, außer der des Hauptsyntheseortes von Melatonin, bei der Regelung physiologischer Prozesse, die durch die Photoperiode gesteuert werden, ist unklar. Es wurde mehrfach nachgewiesen, daß auch melatoninfreie Pinealextrakte oder aus der Epiphyse isolierte Peptide, insbesondere eine AVT-ähnliche Substanz, das endokrine System beeinflussen (EBELS et al. 1978, PÉVET 1979). Bisher sind aber weder ihre Struktur noch ihr Syntheseort oder ihr Zusammenhang mit den Wirkungen von Photoperiode und Melatonin aufgeklärt.

Über Zielorgan(e) und Rezeptoren für Melatonin ist bisher wenig bekannt. Obwohl das Hormon in den verschiedensten Geweben nachgewiesen wurde, weist doch die Mehrzahl der Untersuchungen auf Wirkorte in oder in der Nähe der Hypothalamus-Hypophysen-Region hin. So hemmt periphere oder zentrale Melatoninadministration die Sekretion von Gonadotropinen (FRASCHINI et al. 1969, MESS et al. 1978) und Prolaktin (REITER et al. 1976). Läsionen im Gebiet des Nucleus suprachiasmaticus (RUSAK 1980) oder im dorsalen Raphe-Kern (RUSZAS et al. 1980) verhindern den antigonadotropen Effekt. Melatonin hemmt die Akkumulation des Transmitters Serotonin in hypothalamischen Synaptosomen

(CARDINALI 1975) und verändert die Spontanaktivität von Neuronen des Hypothalamus (DEMAINE u. KANN 1979). Untersuchungen am Menschen, nach denen Melatoningaben bei psychischen Störungen (WETTERBERG et al. 1976, 1977) oder Schlafstörungen (SIZONENKO et al. 1979) ausgleichend wirken können, weisen ebenfalls auf zentrale Rezeptorsysteme hin. Neuerdings wird die Möglichkeit diskutiert, daß Melatonin die Funktion eines Transmitters ausüben könnte.

C. Biochemische Nachweismethoden für Melatonin

Die Nachweismethoden für Melatonin, die Aufschlüsse über die Bindungsorte und die direkte Wirkung von Melatonin ermöglichen könnten, sind rezent und bezüglich ihrer Zuverlässigkeit und Genauigkeit umstritten. Die älteste der angewandten Methoden ist ein von RALPH u. LYNCH (1970) entwickelter Bioassay, in dem die Melatoninkonzentrationen anhand der Kontraktionen von Melanophoren in Kaulquappenhaut bestimmt wird. Sie wird wegen ihrer geringen Empfindlichkeit und wegen des hohen zeitlichen und finanziellen Aufwandes nur selten angewendet. Auch fluorimetrische Bestimmungen (VIVIEN-ROELS et al. 1979) erscheinen wegen ihrer mangelnden Spezifizität und wegen des technischen Aufwandes ungeeignet. Dagegen ist der Nachweis von Melatonin mit Gaschromatographie-Massenspektrometrie (CATTABENI et al. 1972, WILSON et al. 1977) äußerst spezifisch und sehr genau (bis zu 0,1 pg), hat aber den Nachteil, daß er sehr kostspielige Apparate erfordert und die Anzahl der meßbaren Proben pro Meßreihe beschränkt ist.

Die zur Zeit am häufigsten angewandte Methode ist der Radioimmunoassay (ARENDT et al. 1975, LEVINE u. RICEBERG 1975, ROLLAG u. NISWENDER 1976, WURZBURGER et al. 1976, KENNAWAY et al. 1977, WETTERBERG et al. 1978). Er hat den

Vorteil, daß er in fast jedem Laboratorium mit verhältnismäßig wenig Aufwand durchgeführt werden kann und die Bestimmung vieler Proben zur gleichen Zeit erlaubt. Die Melatonin-Antiseren sind im allgemeinen sehr empfindlich und ermöglichen zum Teil Messungen von weniger als 10 pg; ihre Spezifizität ist dagegen umstritten.

Die radioimmunologische Bestimmung von Melatonin setzt ebenso wie andere Meßmethoden die Extraktion des Hormons aus der Körperflüssigkeit oder dem Gewebe und oft auch die Reinigung des Extraktes voraus. Da aber das Extraktions- und Reinigungsverfahren je nach der Art des Antiserums, der Tierart und des Gewebes bzw. der Flüssigkeit variiert werden muß (ARENDT, KENNAWAY mündl. Mitteilung), ist auch die Anwendung des Radioimmunoassays bisher nur beschränkt möglich.

Eine von WETTERBERG u. ERIKSSON (1980) in Zusammenarbeit mit 12 verschiedenen Laboratorien durchgeführte Studie zeigt die relative Zuverlässigkeit von Melatoninbestimmungen mit radioimmunologischen Methoden. In dieser Studie untersuchten die Laboratorien unabhängig voneinander Proben gesammelten und gemischten Menschenserums mit unbekanntem Melatoningehalt. Die Ergebnisse differierten um $\pm$30% (Standardabweichung), sodaß eine Aussage über den wahren Hormongehalt des Serums nur in Annäherung möglich war. In entsprechender Weise sind bisher veröffentlichte Daten über Melatoninkonzentrationen, die radioimmunologisch gemessen wurden, nicht als Absolutwerte zu interpretieren. Dieser Umstand ist insbesondere bei klinischen Untersuchungen zu berücksichtigen, in denen Melatoninmessungen für die Diagnose und Medikation vor allem psychischer Krankheiten zunehmend an Bedeutung gewinnen.

Dennoch können Bestimmungen von Melatonin mit radioimmunologischen Methoden durchaus Aufschluß über rhythmische

Veränderungen des Hormonspiegels geben. So wurden bei Schafen jahreszeitliche Unterschiede in den nächtlichen Melatoninwerten gefunden (ca. 200 pg/ml Serum im Herbst und Frühjahr und ca. 500 pg/ml im Sommer), und beim Menschen wurden monatliche und jährliche Schwankungen (Nachtwerte zwischen ca. 20 und ca. 120 pg/ml Serum) nachgewiesen (ARENDT 1979). Die individuellen Unterschiede im Hormonspiegel waren bei diesen Untersuchungen zwar beträchtlich, doch die rhythmischen Änderungen im Melatoningehalt waren sehr deutlich.

Der bei den Schneehasen in gemischtem Serum ermittelte Melatoningehalt von ca. 425 pg/ml stellt einen annähernden Mittelwert aus Tages- und Nachtwerten dar. Dieser Mittelwert ist im Vergleich zu den vorher genannten Werten sehr hoch. Die Fortsetzung der in dieser Arbeit dargestellten Untersuchungen wird zeigen, ob dieser hohe Melatoningehalt auf extrem hohen Nachtwerten oder auf einem allgemein höheren Hormonspiegel beruht, und auch eine Aussage über annuale und circannuale Schwankungen des Melatoninspiegels bei Schneehasen ermöglichen.

ZUSAMMENFASSUNG

Der Einfluß der Photoperiode und des Pinealhormons Melatonin auf jahreszeitlich variierende physiologische Prozesse wurde bei Schneehasen (Lepus timidus L.) untersucht.

Eine Langzeitstudie sollte zeigen, ob jahresperiodische Änderungen von Körpergewicht, Hodengröße und Fellfärbung von der Photoperiode gesteuert werden, und ob ihnen eine circannuale, endogene Ryhthmik zugrunde liegt. Hierzu wurden zwei Versuchstiergruppen 18 Monate lang in natürlicher Photoperiode und in konstantem Licht-Dunkel-Wechsel von 12 Stunden Licht/12 Stunden Dunkelheit gehalten und Änderungen in den genannten Funktionen in 14-tägigen Abständen registriert. Die Beobachtungen ergaben, daß jahresrhythmische Schwankungen in Hodengröße und Fellfärbung durch die Photoperiode gesteuert werden, während das Körpergewicht von diesem Umweltfaktor nicht beeinflußt wird. Bei keiner der drei Funktionen wurden unter den gegebenen Bedingungen circannuale Veränderungen festgestellt.

Zu drei verschiedenen Jahreszeiten wurde geprüft, inwiefern der jahreszeitliche Zustand der Versuchstiere die Wirkung exogenen Melatonins und unterschiedlicher Photoperioden beeinflußt. Schneehasen mit Melatonin-Implantaten oder Kontroll-Implantaten wurden jeweils im Sommer, Herbst und Winter 7 Wochen lang langen (LD 16:8) bzw. kurzen (LD 8:16) Photoperioden ausgesetzt. Die Änderungen in Hodengröße und Fellfärbung wurden wöchentlich registriert und die Hoden am Ende jeden Versuches histologisch untersucht. Im Sommer und Herbst stimulierten sowohl kurze Photoperioden als auch Melatonin die Regression der Hoden und die Weißfärbung des Felles. Im Winter dagegen hatten weder die Photoperioden noch Melatonin eine Wir-

kung, die Tiere waren offensichtlich refraktär gegen die Behandlungen. Wie die Versuche im Sommer und Herbst zeigten, führt die Kombination von kurzen Photoperioden mit Melatoningaben zu einem vorzeitigen Beginn des refraktären Zustandes. Die Ergebnisse lassen annehmen, daß Melatonin nicht direkt anti- oder progonadotrop wirkt, sondern bei der Regelung des zeitlichen Ablaufs vermehrungsphysiologischer Prozesse wesentlich mitwirkt.

In einer Serie von Experimenten wurde die Bestimmung von Melatonin im Serum mit radioimmunologischen und gaschromatographisch-massenspektrometrischen Methoden versucht. Vorläufige Messungen ergaben 425 ± 45 pg Melatonin/ml gemischten Hasenserums. Die Verläßlichkeit der angewandten Methoden wird eingehend diskutiert.

LITERATURANGABEN

ALLAIN, D. and J. ROUGEOT (1980): Induction of autumn molt in mink (Mustela vison Peale and Beauvois) with melatonin. Reprod. Nutr. Dévelop. 20, (1A), S. 197-201

ARENDT, J. (1979): Radioimmunoassayable melatonin: Circulating patterns in man and sheep. In: The Pineal Gland of Vertebrates including Man. Progress in Brain Research Vol. 52, J. Ariens Kappers and P. Pévet (eds.). Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam, New York, S. 249-258

ARENDT, J., L. PAUNIER and P.C. SIZONENKO (1975): Melatonin radioimmunoassay. J. Clin. Endocrinol. Metab. 40, S. 347-350

ASCHOFF, J. (1954): Zeitgeber der tierischen Jahresperiodik. Naturwissenschaften 41, S. 49-56

ASCHOFF, J. (1955): Jahresperiodik der Fortpflanzung bei Warmblütern. Studium generale Jg. 8, Heft 12, S. 742-776

ASCHOFF, J., U. GERECKE and R. WEVER (1967): Desynchronization of human circadian rhythms. Jap. J. Physiol. 17, S. 450-457

ASCHOFF, J., K. HOFFMANN, H. POHL and R. WEVER (1975): Re-entrainment of circadian rhythms after phase-shifts of the Zeitgeber. Chronobiologia II, No. 1, S. 23-78

AXELROD, J. (1974): The pineal gland: a neurochemical transducer. Science 184, S. 1341-1348

BRACKMANN, M. (1977): Melatonin delays puberty in the Djungarian hamster. Naturwissenschaften 64, S 642

BÜNNING, E. (1973): The physiological clock - circadian rhythms and biological chronometry. The English Universities Press LTD London; Springer Verlag New York, Heidelberg, Berlin. The Heidelberg Science Library Vol. 1

CANGUILHEM, B. (1974): Rôle de la thyroide et des gonades dans le déterminisme du rythme circannuel pondéral du hamster d'Europe (Cricetus cricetus). Arch. Sci. Physiol. 28, S. 321-332

CARDINALI, D.P. (1975): Changes in hypothalamic neurotransmitter uptake following pinealectomy, superior cervical ganglionectomy or melatonin administration to rats. Neuroendocrinology 19, S 91-95

CATTABENI, F., S.H. KOSLOW and E. COSTA (1972): Gas chromatographic - mass spectrometric assay of four indole alkylamines of rat pineal. Science 178, S. 166-168

DAVIS, G.J. and R.K. MEYER (1972): The effect of daylength on pituitary FSH and LH and gonadal development of snowshoe hares. Biol. Reprod. 6, S. 264-269

DEMAINE, C. and H.C. KANN (1979): Hypothalamic neurones as possible target cells for pineal indoles. J. Physiol. 291, S 49-50P

DESJARDINS, C. (1979): Potential sources of variation affecting studies on pituitary-gonad function. In: Animal Models for Research on Contraception and Fertility, N.J. Alexander (ed.), Harper & Row publishers, Hagerstown, MD., S. 13-32

DESJARDINS, C. and M.J. LOPEZ (1980): Sensory and non-sensory modulation of testis function. In: Testicular development, structure and function, A. Steinberger and E. Steinberger (eds.). Raven Press New York, S. 381-388

EBELS, I. and B. BENSON (1978): A survey of the evidence that unidentified pineal substances affect the reproductive system in mammals. In: Progress in Reproductive Biology: The Pineal and Reproduction, R.J. Reiter (ed.). S. Karger Verl. Basel, München, Paris, London, New York, Sydney, S 51-89

FARNER, D.S. (1961): Comparative physiology: photoperiodicity. Ann. Rev. Physiol. 23, S. 71-96

FARNER, D.S., R.A. LEWIS and T.R. DARDEN (1973): Photoperiodic control mechanisms: homoiothermic animals. In: Biology data book, P.L. Altmann and D.S. Dittmer (eds.). Second edition, Vol. 2, Bethesda, Md.: Fed. Amer. Soc. Exper. Biol., S. 1047-1052

FRASCHINI, F., F. PIVA and L. MARTINI (1969): Indole compounds and FSH secretion. In: Program of the 51st Meeting of the Endocrine Soc. (USA), S. 80

FLUX, J.E.C. (1965): Timing of the breeding season in the hare, Lepus europaeus Pallas, and rabbit, Oryctolagus cuniculus (L.). Mammalia 29, S. 557-562

GOLDMAN, B., V. HALL, C. HOLLISTER, P. ROYCHOUDHURY, L. TAMARKIN and W. WESTROM (1979): Effects of melatonin on the reproductive system in intact and pinealectomized male hamsters maintained under various photoperiods. Endocrinol. 104, S. 82-88

GOSS, R.J. (1977): Photoperiodic control of antler cycles in deer. IV. Effect of constant light-dark ratios on circannual rhythms. J. Exp. Zool. 201 (3), S. 379-382

GOSS, R.J., C.E. DINSMORE, L.N. GRIMES and J.K. ROSEN (1974): Expression and suppression of the circannual antler growth cycle in deer. In: Circannual Clocks,E.T. Pengelley (ed.). Academic Press New York, San Francisco, London, S. 393-422

GWINNER, E. (im Druck): Annual rhythms : circannual rhythms. Handbook of Behavioral Neurobiology, Vol. V, J. Aschoff (ed.). Plenum Press New York

HELLER, H.C. and T.L. POULSON (1970): Circannian rhythms - II. Endogenous and exogenous factors controlling reproduction and hibernation in chipmunks (Eutamias) and ground squirrels (Spermophilus). Comp. Biochem. Physiol. 33, S. 357-383

HERBERT, J. (1971): The role of the pineal gland in the control by light of the reproductive cycle of the ferret. In: The Pineal Gland, G.E.W. Wolstenholme and J. Knight (eds.). Churchill Livingstone Edinburgh, S. 303-327

HOFFMANN, K. (1973): The influence of photoperiod and melatonin on testis size, body weight, and pelage colour in the Djungarian hamster (Phodopus sungorus). J. comp. Physiol. 85, S. 267-282

HOFFMANN, K. (1974a):Synchronisation biologischer Periodik durch Licht. Mitt. Max-Planck-Ges. Heft 1, S. 18-35

HOFFMANN, K. (1974b): Testicular involution in short photoperiods inhibited by melatonin. Naturwissenschaften 61, S. 364-365

HOFFMANN, K. (1977): Die Funktion des Pineals bei der Jahresperiodik der Säuger. Nova Acta Leopoldina 46, No. 225, S. 217-219

HOFFMANN, K. (1978): Effects of short photoperiods on puberty, growth and molt in the Djungarian Hamster (Phodopus sungorus). J. Reprod. Fert. 54, S. 29-35

HOFFMANN, K. (1979): Photoperiod, pineal, melatonin and reproduction in hamsters. In: The Pineal Gland of Vertebrates including Man. Progress in Brain Research, Vol.52, J. Ariens Kappers and P. Pévet (eds.). Elsevier/North Holland Biomedical Press Amsterdam, New York, S. 397-415

HOFFMANN, K. and I. KÜDERLING (1975): Pinealectomy inhibits stimulation of testicular development by long photoperiods in a hamster. Experientia 31, S. 122-123

HOFFMANN, K. and I. KÜDERLING (1977): Antigonadal effects of melatonin in pinealectomized Djungarian hamsters. Naturwissenschaften 64, S. 339-340

IMMELMANN, K. (1967): Periodische Vorgänge in der Fortpflanzung tierischer Organismen. Studium Generale Jg. 20, Heft 1, S. 15-32

JACKES, A.D. and A. WATSON (1975): Winter whitening of Scottish mountain hares (Lepus timidus scoticus) in relation to daylength, temperature and snowlie. J. Zool. Lond. 176, S. 403-409

KAMBERI, I.A., R.S. MICAL and J.C. PORTER (1971): Effects of melatonin and serotonin on the release of FSH and prolactin. Endocrinology 88, S. 1288-1293

KAPPERS, J.A. (1976): The mammalian pineal gland, a survey. Acta Neurochirurgica 34, S. 109-149

KENNAWAY, D.J., R.G. FRITH, G. PHILLIPOU, C.D. MATTHEWS and R.F. SEAMARK (1977): A specific radioimmunoassay for melatonin in biological tissue and fluids and its validation by gas chromatography mass spectrometry. Endocrinology 101, S. 119-127

KENNAWAY, D.J. and R.F. SEAMARK (1980): Circulating levels of melatonin following its oral administration or subcutaneous injection in sheep and goats. Aust. J. Biol. Sci. 33, S. 349-354

KLEIN, D.C. and J.L. WELLER (1972): Rapid light-induced decrease in pineal serotonin-N-acetyltransferase activity. Science 177, S. 532-533

LEVINE, L. and L.J. RICEBERG (1975): Radioimmunoassay for melatonin. Res. Comm. Chem. Pathol. 10, S. 693-702

LINCOLN, G.A. (1976): Seasonal changes in the pineal gland related to the reproductive cycle in the male hare, Lepus europaeus. J. Reprod. Fert. 46, S. 489-491

LYMAN, C.P. (1943): Control of coat colour in the varying hare Lepus americanus Erxleben. Bull. Mus. Comp. Zoöl. XCIII (3), S. 393-461

MESS, B., G.P. TRENTINI and L. TIMA (1978): Role of the pineal gland in the regulation of ovulation. Studia Biologica Academiae Scientiarum Hungaricae, Akadémiai Kiadó Budapest, S. 1-104

MOORE, R.Y. (1978): The innervation of the mammalian pineal gland. In: Progress in Reproductive Biology: The Pineal and Reproduction, R.J. Reiter (ed.), S.Karger Verl. Basel, München, Paris, London, New York, Sydney, S. 1-30

MROSOVSKY, N. (1978): Circannual cycles in hibernators. In: Strategies in Cold: Natural Torpidity and Thermogenesis, L.C.H. Wang and J.W. Hudson (eds.). Academic Press New York, San Francisco, London, S. 21-65

MROSOVSKY, N. (1980): Circannual cycles in golden-mantled ground squirrels: experiments with food deprivation and effects of temperature on periodicity. J. comp. Physiol. 136, S. 355-360

PENGELLEY, E.T. and S.J. ASMUNDSON (1974): Circannual rhythmicity in hibernating mammals. In: Circannual Clocks, E.T. Pengelley (ed.). Academic Press New York, San Francisco, London, S. 95-160

PÉVET, P. (1979): Secretory processes in the mammalian pinealocyte under natural and experimental conditions. In: The Pineal of Vertebrates including Man. Progress in Brain Research, Vol. 52, J. Ariens Kappers and P. Pévet (eds.). Elsevier/North Holland Biomedical Press Amsterdam, New York, S. 149-194

RALPH, C.L. and H.J. LYNCH (1970): A quantitative melatonin bioassay. Gen Comp. Endocrinol. 15, S. 334-338

REITER, R.J. (1972): Evidence for refractoriness of the pituitary-gonadal axis to the pineal gland in golden hamsters and its possible implications in annual reproductive rhythms. Anat. Rec. 173, S. 365-372

REITER, R.J. (1974): Circannual reproductive rhythms in mammals related to photoperiod and pineal function: a review. Chronobiologia Vol. I, No. 4, S. 365-395

REITER, R.J. (1977): The Pineal Vol. 2, Annual Research Reviews, Eden Press, S. 1-184

REITER, R.J. (1978): Interaction of photoperiod, pineal and seasonal reproduction as exemplified by findings in the hamster. In: Progress in Reproductive Biology: The Pineal and Reproduction, R.J. Reiter (ed.). S. Karger Verl. Basel, München, Paris, London, New York, Sydney, S. 169-190

REITER, R.J., M.K. VAUGHAN, D.E. BLASK and L.Y. JOHNSON (1974): Melatonin: its inhibition of pineal antigonadotrophic activity in male hamsters. Science 185, S. 1169-1171

REITER, R.J., M.K. VAUGHAN, D.E. BLASK and L.Y. JOHNSON (1975): Pineal methoxyindoles: new evidence concerning their function in the control of pineal-mediated changes in the reproductive physiology of male golden hamsters. Endocrinol. 96, S. 206-213

REITER, R.J. and M.K. VAUGHAN (1975): A study of indoles which inhibit pineal antigonadotrophic activity in male hamsters. Endocrine Research Communications 2, S. 299-308

REITER, R.J., D.E. BLASK, L.Y. JOHNSON, P.K. RUDEEN, M.K. VAUGHAN and P.J. WARING (1976): Melatonin inhibition of reproduction in the male hamster: its dependency on time of day of administration and on intact and sympathetically innervated pineal gland. Neuroendocrinology 22, S. 107-116

REITER, R.J., L.J. PETTERBORG and R.C. PHILO (1979): Refractoriness to the antigonadotrophic effects of melatonin in male hamsters and its interruption by exposure of the animals to long daily photoperiods. Life Sci. 25, S. 1571-1576

RUSAK, B. (1980): Suprachiasmatic lesions prevent an antigonadal effect of melatonin. Biol. Reprod. 22, S. 148-154

RUSZAS, C., C.F. DE GAETANI, G.P. TRENTINI and B. MESS (1980): Relationship between pineal gland and midbrain serotoninergic system in the regulation of ovulation. XIth International Congress of the International Society of Psychoneuroendocrinology, Florence, June 16-20, 1980, Abstract S. 154

ROLLAG, M.D. and G.D. NISWENDER (1976): Radioimmunoassay of serum concentrations of melatonin in sheep exposed to different lighting regimens. Endocrinol. 98, S. 482-489

ROLLAG, M.D., P.J. O'CALLAGHAN and G.D. NISWENDER (1978): Serum melatonin concentrations during different stages of the annual reproductive cycle in ewes. Biol. Reprod. 18, S. 279-283

ROWAN, W. and L.B. KEITH (1959): Monthly weights of snowshoe hares from north-central Alberta. J. Mammal. 40, S. 221-225

RUST, C.C. and R. MEYER (1969): Hair colour, molt and testis size in male, short-tailed weasels treated with melatonin. Science 165, S. 921-922

SADLEIR, R.M.F.S. (1969): The Ecology of Reproduction in Wild and Domestic Mammals. Methuen, London.

SIZONENKO, P.C., D.C. MOORE, L. PAUNIER, A. BEAUMANOIR and A. NAHORNY (1979): Melatonin secretion in relation to sleep in epileptics. In: The Pineal of Vertebrates Including Man. Progress in Brain Research Vol. 52, J. Ariens Kappers and P. Pévet (eds.). Elsevier/North Holland Biomedical Press Amsterdam, New York, S. 549-551

SPAGNESI, M. (1973): Brevi note sull'allevamento in cattività della lepre bianca (Lepus timidus L.). Ricerche di Biologia della Selvaggina, No. 55, S. 1-29

STETSON, M.H., K.S. MATT and M. WATSON-WHITMYRE (1976): Photoperiodism and reproduction in golden hamsters: circadian organization and the termination of photorefractoriness. Biol. Reprod. 14, S. 531-537

TAMARKIN, L., W. WESTROM, A. HAMILL and B. GOLDMAN (1976): Effect of melatonin on the reproductive systems of male and female syrian hamsters: a diurnal rhythm in sensitivity to melatonin. Endocrinol. 99, S. 1534-1541

TAMARKIN, L., N.G. LEFEBVRE, C.W. HOLLISTER and B.D. GOLDMAN (1977): Effect of melatonin administered during the night on reproductive function in the syrian hamster. Endocrinol. 101, S. 631-634

TUREK, F.W. (1977): Antigonadal effects of melatonin in pinealectomized and intact male hamsters. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 155, S. 31-34

TUREK, F.W., C. DESJARDINS and M. MENAKER (1975): Melatonin: antigonadal and progonadal effects in male golden hamsters. Science 190, S. 280-282

TUREK, F.W., C. DESJARDINS and M. MENAKER (1976): Melatonin-induced inhibition of testicular function in adult golden hamsters. Pro. Soc. Exp. Biol. Med. 151, S. 502-506

TUREK, F.W. and S.H. LOSEE (1978): Melatonin-induced testicular growth in golden hamsters maintained on short days. Biol. Reprod. 18, S. 229-305

THORPE, P.A. and J. HERBERT (1974): The role of the pineal gland in the response of ferrets to artificially restricted photoperiods. J. Endocrinol. 63, S. 56-57P

THORPE, P.A. and J. HERBERT (1976): Studies on the duration of the breeding season and photorefractoriness in female ferrets pinealectomized or treated with melatonin. J. Endocrinol. 70, S. 255-262

VIVIEN-ROELS, B., J.M GUERNE, F.C. HOLDER and M.D. SCHROEDER (1979): Comparative immunohistochemical, radioimmunological and biological attempt to identify arginine-vasotocin (AVT) in the pineal gland of reptiles and fishes. In: The Pineal Gland of Vertebrates including Man. Progress in Brain Research Vol. 52, J. Ariens Kappers and P. Pévet (eds.). Elsevier/North Holland Biomedical Press Amsterdam, New York, S. 459-463

WETTERBERG, L., J. ARENDT, L. PAUNIER, P.C. SIZONENKO, W. VAN DONSELAAR and T. HEYDEN (1976): Human serum melatonin changes during the menstrual cycle. J. clin. Endocrinol. Metab. 42, S. 185-188

WETTERBERG, L., O. ERIKSSON, Y. FRIBERG and B. VANGBO (1978): A simplified radioimmunoassay for melatonin and its application to biological fluids. Preliminary observations on the half-life of plasma melatonin in man. Clin. Chim. Acta 86, S. 169-177

WETTERBERG, L. (1979): Clinical importance of melatonin. In: The Pineal Gland of Vertebrates including Man. Progress in Brain Research Vol. 52, J. Ariens Kappers and P. Pévet (eds.). Elsevier/North Holland Biomedical Press Amsterdam, New York, S. 539-547

WETTERBERG, L. and O. ERIKSSON (1980): Melatonin in human serum - a collaborative study of current radioimmunoassays. Vortrag auf dem "International Symposium on Melatonin", Bremen, 27.-30. Sept. 1980.

WEVER, R. (1970): Zur Zeitgeberstärke eines Licht-Dunkel-Wechsels für die circadiane Periodik des Menschen. Pflügers Arch. ges. Physiol. 321, S. 133-142

WILSON, B., W. SNEDDEN, R.E. SILMAN, I. SMITH and P. MULLEN (1977): A gas chromatography - mass spectrometry method for the quantitative analysis of melatonin in plasma and cerebrospinal fluid. Analytical Biochemistry 81, S. 283 -291

WURZBURGER, R.J., K. KAWASHIMA, R.L. MILLER and S. SPECTOR (1976): Determination of rat pineal gland melatonin content by a radioimmunoassay. Life Sci. 18, S. 867-878

LEBENSLAUF

26.2.1946	geboren in Dabringhausen (Rhein-Wupper-Kreis) Eltern: Fritz Küderling, Dipl.-Ing. Marianne, geb. Klein
April 1952- März 1956	Besuch der Grundschule Hattingen/Ruhr
April 1956- März 1965	Besuch des neusprachlichen Gymnasiums "Theodor-Körner-Schule" in Bochum-Dahlhausen. Abschluß: Abitur
April 1965- April 1967	Ausbildung zur landwirtschaftlich-technischen Assistentin am Max-Planck-Institut für Kulturpflanzenzüchtung Hamburg-Volksdorf. Abschluß: staatliche Anerkennung als LTA
Mai 1967- April 1969	Berufsausübung als LTA am Max-Planck-Institut für Verhaltensphysiologie in Seewiesen/Starnberg
April 1969- Oktober 1969	Berufsausübung als LTA am Zoologischen Institut der Universität München
ab Oktober 1969	Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität München
Januar 1974- Januar 1976	Durchführung der Diplomarbeit im Max-Planck-Institut für Verhaltensphysiologie, Erling-Andechs, unter der Betreuung von Dr. Klaus Hoffmann; Thema:

"Untersuchungen zum Einfluß der Epiphysis cerebri auf die Steuerung der Jahresperiodik beim Dsungarischen Zwerghamster (Phodopus sungorus PALLAS) in Abhängigkeit von der Photoperiode." Offizieller Vertreter der Diplomarbeit vor der Fakultät: Prof. Dr. Hansjochem Autrum, Leiter des Zoologischen Institutes der Universität München

Januar 1976 — Diplom in Biologie mit den Fächern Zoologie, Genetik, Biochemie, Anthropologie und Humangenetik

ab Oktober 1976 — Durchführung der vorliegenden Doktorarbeit im Pharmakologischen Institut der Universität Mailand, Lehrstuhl für Chemotherapie, unter der Leitung von Prof. Franco Fraschini, M.D.

Dissertationsdruck: Schnelldruck Schwabing GmbH · Werneckstr. 27 · 8000 München 40 · ☎ 089/39 12 95